

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Inimese papilloomiviiruste kvaasi-ja pseudovirionide konstrueerimine ning
nakatamisvõime analüüsimine U2OS ja 293FT rakuliinides**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Annika Laanemets

Juhendaja Marko Piirsoo, PhD

TARTU 2018

INFOLEHT

Inimese papilloomiviiruste kvaasi-ja pseudovirionide konstrueerimine ning nakatamisvõime analüüsimine U2OS ja 293FT rakuliinides.

Papilloomiviirused on väikesed DNA viirused, mis nakatavad epiteelkoe keratinotsüüte ja nende elutsüklil on tihedalt seotud epiteelkoe rakkude jagunemisega. Üks võimalus papilloomiviiruste uurimiseks ning nakatamisvõimeliste virionide saamiseks laboritingimustes on valmistada sünteetilisi viiruspartikleid. Käesolev bakalaureusetöö keskendub HPV11 genoomi ja HPV18 varajasi avatud lugemisraame sisaldavate kvaasivirionide ning GFP-d ekspresseerivate pseudovirionide valmistamisele ning nende nakatamisvõime hindamisele U2OS ja FT293 rakkudes.

Märksõnad: HPV, pseudovirion, kvaasivirion, viirus-laadsed partiklid

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Construction and virulence analysis of human papillomaviruses quasi-and pseudovirions in U2OS and 293FT cell lines

Papillomaviruses are small DNA viruses that infect keratinocytes and their life cycle is tightly linked to epithelial differentiation. One way to study papillomaviruses and get infectious virions in laboratory is to make synthetic virus particles. This bachelor's thesis focus on making HPV11 full genome and HPV18 early open reading frames containing quasvirions and construction of pseudovirions that express GFP. Virulence of prepared virions was analyzed in U2OS and FT293 cells.

Keywords: HPV, pseudovirions, quasvirions, virus-like particles

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Inimese papilloomiviirused	7
1.2 Inimese papilloomiviiruse genoomne ülesehitus	7
1.3 HPV valkude funktsioonid	8
1.4 HPV elutsükel	10
1.4.1 Rakku sisenemine	12
1.4.2 Esialgne amplifikatsioon	13
1.4.3 Stabiilne säilumisaasta ehk latentne infektsioon	14
1.4.4 Vegetatiivne amplifikatsioon	14
1.4.5 Virionide moodustumine ja vabanemine	15
1.5 Inimese papilloomiviiruste uurimine rakukultuuris	15
1.5.1 Viiruse-sarnased partiklid (VLP-d)	16
1.5.2 Pseudovirionid (PsV-d)	17
1.5.3 Kvaasivirionid (QV)	18
1.5.4 Naturaalsed viirused	19
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	20
2.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjalid ja meetodika	20
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid	20
2.2.2 Rakuliinid ja söötmed	21
2.2.3 Plasmidi p16shell transformatsioon ja puhastamine	21
2.2.4 Rakkude lüüs	23
2.2.5 Soolaga ekstraheerimine ja viiruste puhastamine	23
2.2.6 Nakatamine	24
2.2.7 Fluorestsentsmikroskoopia	25
2.2.8 Totaalse DNA eraldamine rakkudest ja viiruse preparaatidest	25
2.2.9 Southern blot	26
2.2.10 Hübridisatsiooniproovide valmistamine	26
2.2.11 Hübridisatsioon	27

2.3	Tulemused ja arutelu	27
2.3.1	p16shell plasmiidi õigsuse kontroll	27
2.3.2	Southern blot analüüs	29
2.3.3	HPV16-GFP virioni nakatamisvõime hindamine erinevates lahjendustes	32
KOKKUVÕTE.....		34
KASUTATUD KIRJANDUS		36
	Kirjanduse loetelu	36
	Kasutatud veebiaadressid	42
LISA 1		43
LISA 2		44
LISA 3		45
LISA 4		46
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks		47

KASUTATUD LÜHENDID

bp – aluspaar (*base pair*)

DDR – DNA kahjustuse vastus (*DNA damage response*)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EGF – epidermaalne kasvufaktor (*epithelial growth factor*)

FCS – veise loote seerum (*fetal calf seerum*)

GFP – roheline fluorestseeruv valk (*green flourescent protein*)

HPV – inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)

IMDM – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

LB – lüsogeenne sööde (*lysogeny broth*)

ND – tuuma domeenid (*nuclear domain*)

pA – polüadenüleerimis sait (*polyadenylation site*)

PBS – fosfaatpuhver (*phosphate-buffered saline*)

PDGF – trombotsüütide kasvufaktor (*platelet-derived growth factor*)

pRB – retinoblastoomi valk (*retinoblastoma protein*)

PsV – pseudovirion

QV – kvaasivirion (*quasivirion*)

SV40 – ahviviirus 40 (*Simian virus 40*)

TAE – tris-atsetaat-EDTA (*tris-acetate-EDTA*)

VLP – viiruse-sarnane partikkel (*virus-like particle*)

SISSEJUHATUS

Inimese papilloomiviirused ehk HPV-d (*Human papillomaviruses*) on väikesed kaheaheelalise DNA-ga viirused papilloomiviiruste perekonnast. Nad nakatavad naha ja limaskestade keratinotsüüte ning nakkuse eri etapid on tihedalt seotud epiteelkoe rakkude diferentseerumisega. Papilloomiviirusega nakatumine toimub otsesel kokkupuutel nakatunud inimese naha või limaskestaega. Viirusnakkus on populatsioonis laialt levinud ja üldjuhul kulgeb asümptomaatiliselt, kuid vahel põhjustavad madala riskiga papilloomiviirused healoomuliste kasvajate ehk tüügaste teket ja kõrge riskiga papilloomiviirused võivad tekitada pahaloolumulisi kasvajaid. Kõige sagedamini on viirused seotud emakakaelavähiga, aga HPV-d võivad põhjustada ka peenise, tupe, naha, päraku ning pea-ja kaelapiirkondade kasvajaid.

Kuigi HPV-de seotus emakakaelavähiga avastati juba 1980-ndatel aastatel, pole olemas viirusvastast ravimit ega täielikku ülevaadet nakkuse eri etappidest, sest viiruse epiteelkoe rakkude jagunemisest sõltuv elutsüklil muudab nende uurimise laboritingimustes keeruliseks. Tänapäeval kasutatakse inimese papilloomiviiruste uurimiseks tihti organtüüpi parvkuultuure või sünteetilisi viiruspartikleid, milleks võivad olla, kas viirus-sarnased partiklid, pseudovirionid või kvaasivirionid. Sünteetilised viiruse partiklid võimaldavad laboritingimustes saada suures hulgas nakatamisvõimelisi viiruseid ning uurida nende erinevaid eluetappe, näiteks rakku sisenemist, replikatsiooni, geenide avaldumist ning teostada neutralisatsiooni analüüse. Viirus-sarnastel partiklidel põhinevad ka kasutuses olevad HPV-vastased vaktsiinid Gardasil ja Cervarix.

Käesoleva bakalaureusetöö 1. osa annab ülevaate inimese papilloomiviiruste elutsüklist, viiruste uurimisest laboritingimustes ning sünteetiliste viiruspartiklite kasutamisest. 2. osa eesmärgiks on valmistada nakatamisvõimelisi papilloomiviiruse pseudoviiruseid, mis võimaldaks uurida papilloomiviiruse nakatamisetappe ja replikatsiooni. Bakalaureusetöö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inimese papilloomiviirused

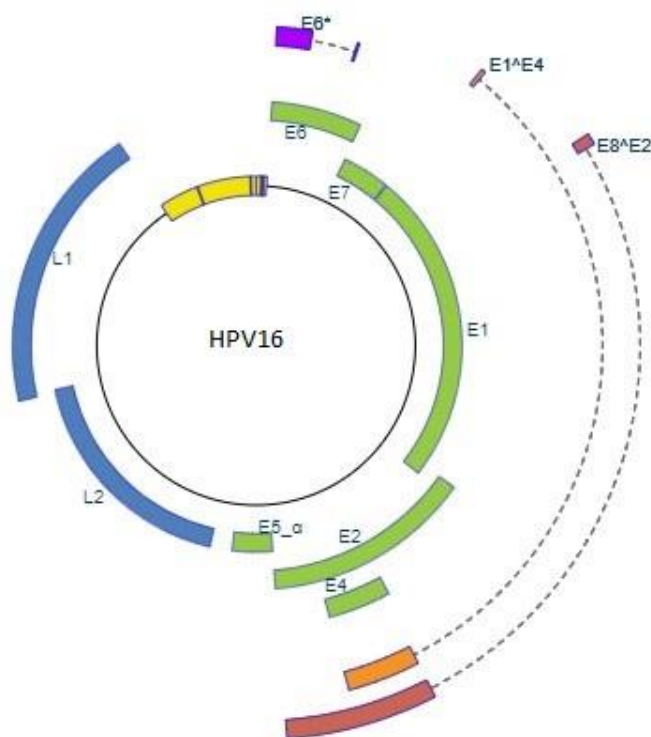
Inimese papilloomiviirused kuuluvad papilloomiviiruste sugukonda. Selle moodustavad väikesed kaheahelalise tsirkulaarse DNA-ga viirused. Neil on ikosaeedrilise kujuga ümbriseta kapsiid, mille diameeter on ~55 nm (Miller, 2012). Kõigile papilloomiviirustele on iseloomulik liigi- ja koespetsiifilisus. Neid on leitud imetajatelt, lindudelt, kaladelt ja roomajatelt (López-Bueno et al., 2016; Shah et al., 2010). Papilloomiviirused jagatakse tüüpideks nende peamist kapsiidivalku L1 kodeeriva geeni nukleotiidses järjestuses põhjal (de Villiers, 2013). Praeguseks on teada üle 300 tüüpi viiruseid, millest üle 200 on inimest nakatavad papilloomiviirused (<http://pave.niaid.nih.gov/>).

HPV-d jagatakse kõrge-ja madalariskiga viirusteks. Kõrgeriskiga viirused võivad põhjustada pahaloormuliste kasvajate teket, näiteks HPV16, HPV18, HPV31, HPV45, HPV58. Neid seostatakse eelkõige emakakaelavähiga, aga ka peenise, tupe, naha ja päraku vähiga („HPV and Cancer“). Papilloomiviirused on seotud ka ligikaudu 20% pea-ja kaelapiirkonna kasvajatega (Pyeon et al., 2005). Madalariskiga viirused võivad tekitada healoomulisi kasvajaid ehk tüükaid. Madalariskiga papilloomiviirusteks on näiteks HPV11, HPV5, HPV6. Inimese papilloomiviirused jagatakse fülogeneesi alusel viide perekonda: alfa-, beta-, gamma-, mu-ja nu-perekonda (Bernard et al., 2010). Perekondade beeta, gamma, mu ja nu viirused nakatavad ainult nahaepiteeli. Alfa perekonda kuuluvad viirused nakatavad nii naha kui ka limaskestaepiteeli (McBride, 2017a). Kõik teadaolevad kõrgeriskiga HPV-d kuuluvad alfa perekonda.

1.2 Inimese papilloomiviiruse genoomne ülesehitus

Papilloomiviiruse genoom on umbes 8000 aluspaari pikk kaheahelaline DNA. Genoomi ülesehitus on näidatud joonisel 1 HPV16 näitel. Genoomis eristatakse varast, hilist ja mittekodeerivat ala. Need kolm regiooni on eraldatud kahe poliadenüleerimisesaidiga (pA): varajane pA ja hiline pA sait. Varajane regioon moodustab üle 50% kogu viiruse genoomist ning kodeerib kuute avatud lugemisraami: E1, E2, E4, E5, E6, E7. Hiline regioon moodustub natuke vähem kui 40% genoomist ja sellel asub kaks avatud lugemisraami L1 ja L2. L1-lt transleeritakse peamine kapsiidivalk L1 ja L2-lt teine kapsiidivalk L2. Kõik papilloomiviiruse

lugemisraamid asuvad ühes DNA ahelas. Mittekodeeriva regiooni moodustab umbes 850 aluspaari. Sellel alal asuvad replikatsiooni alguspunkt (origin), varajane ja hiline promootor ning mitmete transkriptsioonifaktorite seondumiskohad (Zheng ja Baker, 2006).



Joonis 1. HPV16 genoomne ülesehitus. Varajased lugemisraamid (E1-E7) on märgitud rohelisega, hilised lugemisraamid (L1 ja L2) sinisega. Katkendlik joon näitab alternatiivse splaisingu tulemusena tekkivaid mRNA-sid, millelt transleertiakse HPV valgud. Kollasega on märgitud mittekodeeriv regioon, kus asuvad replikatsiooni origin ja promootorid (<https://pave.niaid.nih.gov/>).

1.3 HPV valkude funktsioonid

HPV viiruse genoomilt kodeeritakse 8-10 valku. Varajased valgud nimetatakse E (sõnast *early*) ja hilised valgud L (sõnast *late*). Varajasi valke kodeeritakse kogu viiruse elutsükli vältel, hiliseid valke kodeeritakse elutsükli hilisemates etappides, kui viirus on jõudnud epiteelkihi ülemistesse kihtidesse. Erinevate viirustüüpide valkude funktsioonid ja ehitus on väga sarnased.

E1 on ATP sõltuv DNA helikaas, mis on vajalik viiruse replikatsiooni algatamiseks ning amplifikatsiooniks. Replikatsiooni originil moodustab E1 kahekordse heksameerse struktuuri, mis käitub kui DNA helikaas ja harutab DNA ahelad lahti ning seondub rakuliste replikatsioonifaktoritega. Enne originile seondumist moodustab E1 valk ajutise kompleksi E2

valguga, et tagada täpne origini ära tundmine (Bergvall et al., 2013).

E2 valk on papilloomiviiruste peamine transkriptsiooni regulaator. Ta kasutab rakulisi faktoreid mitmetes viiruse eluetappides ja seostub spetsiifiliselt DNA-le. E2 valgu seondumiskoht DNA-l ja vastavate rakuliste faktorite olemasolu raku tuumas määrab, kas toimub transkriptsiooni aktivatsioon või repressioon. Lisaks on E2 valk oluline DNA replikatsiooni algatamisel, viiruse genoomi jaotamisel tütarakkudesse, vegetatiivsel DNA replikatsioonil, post-transkriptsioonilistes protsessides ning genoomi pakkimisel (McBride, 2013).

E8^{E2} on liitvalk, mis saadakse splaisingu tulemusena E1 alternatiivselt lugemisraamilt kodeeritud järjestuse ühendamisel E2 valgu C-terminaalse otsaga. Selle valgu peamine funktsioon on suruda maha viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni, et säiliks madal genoomi koopiaarv (McBride, 2013).

E4 valk transleeritakse splaisitud mRNA-lt (E1^{E4}), mis sisaldab E1 avatud lugemisraami initsiaatorkoodonit ja esimesi aminohappeid ning E4 geenilt transkribeeritud järjestust (Chow et al., 1987; Milligan et al., 2007; X. Wang et al., 2011; Michelle A. Ozbun, 2002). E4 on oluline genoomi amplifikatsioonil, viiruse vabanemisel rakust ja edasi kandumisel. Kuigi E4 avatud lugemisraam asub genoomis varajases piirkonnas, ekspresseeritakse seda valku peamiselt viiruse elutsükli hilistes etappides (Doorbar, 2013). Arvatakse, et E4 osaleb nakatunud epiteeli ülemistes kihtides keratiini filamentide võrgustiku ümber korraldamisel ja soodustab nii virionide vabanemist (Bryan ja Brown, 2000, 2001).

E5 on lühike transmembraane valk, mida kodeerivad ainult alfa HPV-d. Ta on üks kolmest papilloomiviiruse onkovaigust. E5 aktiveerib rakulisi kasvufaktoreid EGF (epidermaalne kasvufaktor) ja PDGF (trombotsüütide kasvufaktor) ja stimuleerib selle kaudu rakkude jagunemist ja kasvu (DiMaio ja Petti, 2013).

E6 ja E7 on ka HPV onkovaigud. Nende funktsiooniks on hoida rakud jagunemises, takistada peremeesraku väljumist rakutsüklist ning säilitada viiruse replikatsiooniks sobiv keskkond (Cheng et al., 1995; Stubenrauch ja Laimins, 1999). E6 seondub tuumorsupressorvalguga p53 ja suunab selle ubikvitiinsõltuval proteolüütilisele lagundamisele, et vältida p53 vahendatud rakutsükli seiskamist või nakatunud rakkude minekut apoptoosi (Vande Pol ja Klingelhutz, 2013). E7 lagundab tuumorsupressorvalke retinoblastoomi valkude (pRb) perekonnast (Roman ja Munger, 2013) ning põhjustab replikatsiooni stressi ja epigeneetilisi muutusi

(McLaughlin-Drubin et al., 2011). E7 kutsutakse esile ka raku DNA kahjustuse vastuse (DDR) aktivatsiooni, mis on vajalik viiruse DNA replikatsiooniks (Moody ja Laimins, 2009). E5, E6 ja E7 valgud on viirustele olulised ka immuunsüsteemi vältimiseks (DiMaio ja Petti, 2013; Roman ja Munger, 2013; Vande Pol ja Klingelutz, 2013).

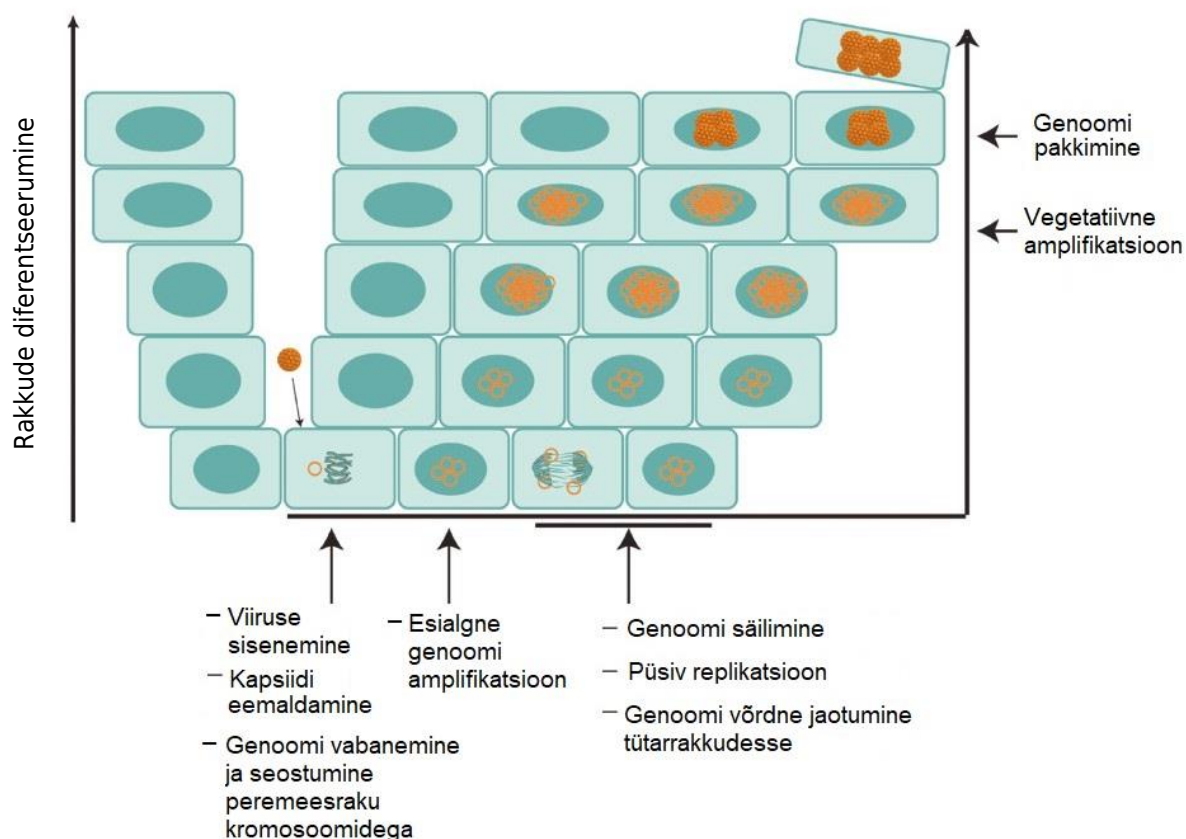
L1 ja L2 on papilloomiviiruste kapsiidi valgud. L1 on HPV peamine kapsiidi valk, ta moodustab viiruse ikosaedrilise kapsiidi ja loob esimese kontakti rakuga seostudes heparaansulfaat proteoglykaanidega (Buck et al., 2013). L2 on oluline viiruse kapsiidi kokkupakkimisel ja nakatamisel. L2 valk jääb pärast viiruse genoomi sisenemist rakku sellega seotuks ning aitab transportida genoomi mööda endotsütoosi radasid rakutuumas (J. W. Wang ja Roden, 2013).

1.4 HPV elutsükkel

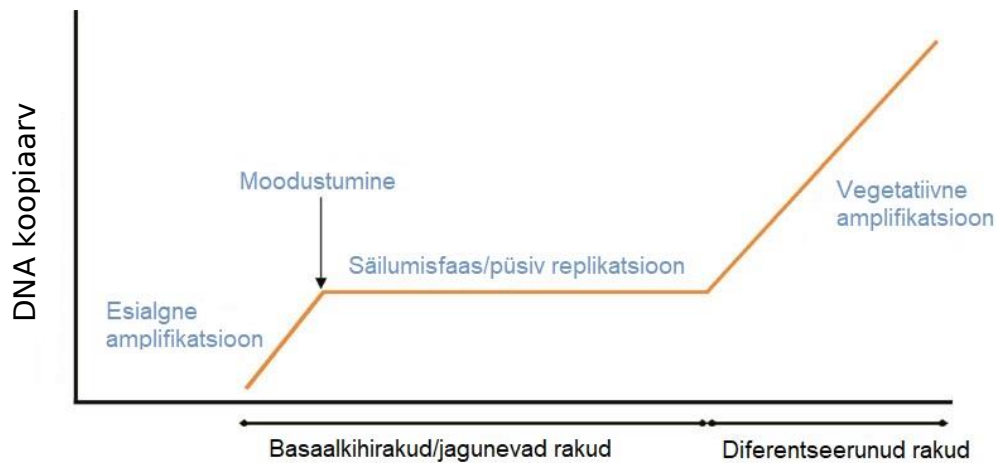
Papilloomiviirused nakatavad naha ja limaskestade epiteelkoe keratinotsüüte ja nende elutsükkel on tihedalt seotud mitmekihilise epiteelkoe loomuliku arenguga. Epidermis ehk naha pinda kattev epiteel koosneb peamiselt keratinotsüütidest. Väiksemal hulgal leidub ka melaniini tootvaid melanotsüüte, immuunsüsteemi kuuluvaid Langerhansi rakke ja Merkeli kompimiskehakesi. Keha pinda katab mitmekihiline sarvestunud lameepiteel, milles on võimalik eristada viit kihti: basaalkiht, ogakiht, sõmerkiht, läikekiht ja sarvkiht. Läikekiht esineb ainult peopesadel ja jalataldadel. Limaskesti katvas sarvestumata epiteelis eristatakse kolme kihti: basaalkiht, ogakiht ja pindmine kiht. Basaalkihis leidub mitootiliselt jagunevaid rakke. Jagunemise käigus tekkinud uued rakud liiguvad järgmisesse kihti, neid nimetatakse keratinotsüütideks. Nemat alustavad migreerumist epidermise pinna suunas kuni nad lõpuks sarvkihi pinnalt irduvad. Sarvkihis on rakud enim diferentseerunud ning kaotanud tuuma ja organellid ning on täidetud praktiliselt ainult keratiini filamentidega (Arend ja Aunapuu, 2012). Limaskesti katvas lameepiteelis moodustavad keratinotsüüdid pindmise kihi (Buck et al. 2013).

Papilloomiviirused kasutavad oma elutsükliks ära kihilise epiteelkoe uuenemise protsesse, et vältida peremeesorganismi immuunvastust (McBride, 2017a). Viiruse elutsükliks eristatakse kolme staadiumit vastavalt sellele, millises epiteelikihis ta paikneb. Need kolm staadiumi on: esialgne genoomi amplifikatsioon, genoomi säilimine ning vegetatiivne amplifikatsioon. Vigastuse kaudu nakatab viirus basaalkihi rakke (Roberts et al., 2007) ja algab pikaajaline püsiv infektsioon (joonised 2 ja 3) (McBride, 2017b). Nakatunud rakkude diferentseerumine

ja epiteeli pinna poole liikumine kutsub esile viiruse replikatsiooni ja geeni ekspressiooni (McBride, 2017b). Basaalkihi rakkudes toimub viiruse genoomi esialgne amplifikatsioon. Edaspidi viiruse ja peremeesraku DNA replikatsioon sünkroniseeritakse. Viiruse vegetatiivne replikatsioon ja hiliste geenide ekspressioon aktiveeritakse alles siis kui peremeesrakud lähevad terminaalsesse diferentseerumisse. Virionid pakitakse kokku epiteeli pindmistes kihtides ja nad vabanevad peamiselt surnud rakkudest koosnevast sarvkihist (McBride, 2017b).



Joonis 2. Papilloomiviiruse elutsükli sõltuvus epiteelkihi jagunevatest rakkudest. Viirus siseneb nahavigastuse kaudu basaalkihi rakkudesse, seal liigub viiruse genoom koos kapsiidivalguga L2 rakutuuma ja viiruse genoom seostub peremeesraku mitootiliste kromosoomidega ning seejärel toimub esialgne amplifikatsioon, mille tulemusena tekib väike koopiaarv viiruse genoomi. Peale seda leiab aset püsiv replikatsioon ning genoomi jaotamine tütarrakkudesse. Epiteelkoe arengu käigus liiguvad diferentseeruvad rakud ülemistesse kihtidesse. Terminaalselt diferentseerunud epiteelkihi rakkudes toimub vegetatiivne amplifikatsioon ning virionid vabanevad epiteeli pindmisest kihist. (Muudetud joonis McBride, 2017a)



Joonis 3. Papilloomiviiruse replikatsioonifaasid. Epiteelkoe alumistes kihtides toimub madala tasemeline genoomi amplifikatsioon, mille tulemusena tekib üsna väike koopiaarv viiruse genoomi. Tekkinud genoomid säilitatakse ekstrakromosomaalsete replitseerumisvõimeliste plasmiidide ehk episoomidena. Genoomi säilumisaasis on replikatsiooni käigus tekkinud viiruse genoomide arv võrdne jagunemise tulemusena tekkinud uute rakkude arvuga. Diferentseerunud rakkudes toimub vegetatiivne amplifikatsioon, mille tulemusena tekib suur koopiaarv viiruse genoomi. (Muudetud joonis McBride, 2017a)

1.4.1 Rakku sisenemine

Papilloomiviirus nakatab mikrovigastuse kaudu epiteeli basaalkihi rakke (Roberts et al., 2007). Esmalt seostub viiruse kapsiidivalk L1 rakumembraani pinnal asuvate heparaansulfaat proteoglükaanidega (Day ja Schelhaas, 2014) ja seejärel kantakse viirus üle sekundaarsele retseptorile. Esmasele retseptorile seostumine kutsub viiruse kapsiidivalkudes esile konformatsioonilised muutused, mis on vajalikud viiruse seostumiseks sekundaarse retseptoriga ning hilisemates rakku sisenemise etappides nagu kapsiidi eemaldamine ja membraani läbimine (Selinka et al., 2003). Sekundaarseks retseptoriks võib olla laminiin 5 (basaalkihi keratinotsüütide poolt sekreteeritud ekstratsellulaarse maatriksi komponent), alfa 6 integriin (retseptorivalk, mida rakud kasutavad ekstratsellulaarsele maatriksile seondumiseks), tetraspaniin CD151 (mitmete hulkraksete organismide membraanivalk) või rakupinnal asuv anneksiin A2 (multifunktsionaalne fosfolipiididega seonduv valk) heterotetrameer, mis koosneb kahest anneksin A2 monomeerist ja ühest kaltsiumit siduva valgu S100A10 dimeerist (Culp, Budgeon, et al., 2006; Evander et al., 1997; Scheffer et al., 2013; Dziduszko ja Ozbun, 2013).

Virion siseneb rakku endotsütoosi teel ja seejärel transporditakse viirus mööda trans-Golgi kompleksi endosomaalseid radasid tuuma (McBride, 2017b). Selle transpordi käigus

eemaldub viiruselt kapsiid, mini-kromosoom jääb seotuks valguga L2 kuni genoom-L2 kompleks on tuuma sisenenud, selle toimumiseks peab rakk minema mitoosi ja lagundama tuuma ümbrise (DiGiuseppe et al., 2016). L2-genoom kompleks seondub raku kondenseerunud kromosoomidega, mis tagab viiruse DNA olemasolu tuumas peale mitoosi (Aydin et al., 2014; DiGiuseppe et al., 2016).

1.4.2 Esialgne amplifikatsioon

Esmased infektsiooni sündmused põhjustavad madala koopiaarvuga viiruse DNA amplifitseerimise, mida säilitatakse jagunevates rakkudes ekstrakromosomaalsete replitseerumisvõimeliste plasmiidide ehk episoomidena (McBride, 2017a). Pärast tuumaplasmasse sisenemist liiguvad L2 valk ja viiruse genoom tuuma domeenide 10 (ND10) juurde. ND10 domeenid on väikesed tuumaplasmas laiali jaotunud sfäärilised kehakesed (Rivera-Molina et al., 2013), kuhu on kogunenud mitmed tuumavalgud (nt Daxx ja Sp100), mis osalevad transkriptsiooni regulatsioonis, kasvu pidurdamisel ja apoptoosis (Florin et al., 2002). Arvatakse, et ND10 on oluline viirusvastases kaitses, aga mingil põhjusel valivad mitmed viirused nende domeenide läheduse varajase transkriptsiooni ja replikatsiooni toimumise kohaks (Everett, 2006). HPV L2 valk reorganiseerib valke Sp100 ja Daxx (Florin et al., 2002), et muuta ümbritsev keskkond sobilikuks viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni alustamiseks (McBride, 2017b). Esialgsed viiruse transkriptid kodeerivad replikatsiooni valke E1 ja E2 (Ozbun, 2002). Need kaks valku suunavad peremeesraku replikatsioonifaktorid viiruse replikatsiooni originile, millele järgneb viiruse genoomi koopiaarvu kiire suurenemine (Kadaja et al., 2009).

Esialgsed amplifikatsiooni sündmused signaliseerivad peremeesrakus DNA kahjustuse vastust (Reinson et al., 2013), mis on vajalik latentse infektsiooni tekitamiseks (McBride, 2017a). Esimesele replikatsioonile järgnev moodustumise etapp on vajalik püsiva infektsiooni tekkimiseks, selle käigus liigub viiruse DNA sobivasse tuumaregiooni samal ajal vältides viiruse vastaseid mehhanisme ja epigeneetilist vaigistamist (Porter et al., 2017).

1.4.3 Stabiilne säilumisfaas ehk latentne infektsioon

Peale esialgset genoomi amplifikatsiooni on kindel koopiarv viiruse DNA-d episoomina basaalkihi rakkudes, järgnevalt toimub viiruse DNA replikatsioon sünkroonselt peremeesraku replikatsiooniga. Püsiva replikatsiooni käigus kahekordistub viiruse genoom peremeesraku rakutsükli S-faasi ajal ja ta jagatakse peaaegu võrdselt mitoosi käigus tekkinud tütarrakude tuumadesse (Kadaja et al., 2009). Genoomi võrdse jaotumise tagab E2 valk seondades viiruse DNA-d raku mitootiliste kromosoomidega (McBride, 2008). E2 valgu N-terminaalses otsas on transaktivatsiooni domeen, mis seondub peremeesraku kromatiiniga ja C-terminaalses otsas asuv DNA sidumise domeen interakteerub konserveerunud saitidega viiruse genoomis (McBride, 2013). Viiruse DNA seotus raku kromatiini transkriptsiooniliselt aktiivsete regioonidega aitab kaasa ka viiruse transkriptsiooni toimumisele (Jang et al, 2009; Helfer et al, 2014).

1.4.4 Vegetatiivne amplifikatsioon

Teine amplifikatsioon leiab aset kihilise epiteeli diferentseeruvates rakkudes ja selle käigus paljundatakse viiruse genoomi suure koopiarvuni, eesmärgiga pakkida see kapsiididesse ja vabastada võimalikult palju virione (McBride, 2008). Vegetatiivse amplifikatsiooni alustamiseks on vajalikud hilise promootori aktiveerimine, raku DNA kahjustuse vastus ning E1 ja E2 valgu kõrge kontsentratsioon (Klumpp ja Laimins, 1999; Moody ja Laimins, 2009). Kui viirusega nakatunud keratinotsüüdid jõuavad diferentseeruva epiteeli ülemistesse kihtidesse vahetatakse viiruse ja E1 ning E2 geeni transkriptsioon E2-reguleeritud varajaselt promootorilt E2-sõltumatu hilise promootori vastu, mis viib E1 ja E2 valgu taseme suure tõusuni rakus (Grassmann et al., 1996; Klumpp ja Laimins, 1999). Hiline promootor on aktiivne ainult diferentseerunud rakkudes ja selle aktiveerimisel osaleb E7 valk (Bodily et al., 2013). E7 valgu poolt põhjustatud pRb perekonna valkude inaktiveerimise tulemuseks on E2F transkriptsioonifaktorite vabanemine ja rakutsükli S faasi sarnast keskkonda loovate geenide ekspressioon (Bodily et al., 2013). DNA kahjustuse vastus aktiveeritakse samuti E7 valgu poolt (Moody ja Laimins, 2009) ja see toob rakutuuma suures hulgas faktoreid, mida viirused kasutavad oma DNA replikatsiooniks (McBride, 2017a). Viiruse teine DNA replikatsioon toimub rekombinatsioonist sõltuvalt (Gillespie et al., 2012; Sakakibara et al., 2013).

1.4.5 Virionide moodustumine ja vabanemine

Viiruse elutsükli lõpetamiseks ekspresseeritakse valke L2 ja L1. L2 on oluline, et rakk väljuks rakutsüklist ning L1 osaleb genoomi pakkimisel (Doorbar et al., 2012). Genoomi kapsiidi pakkimine hõlmab L2 valgu viimist replikatsiooni regioonidesse E2 valgu vahendusel, sellele eelneb L1 ekspressioon ja ikosaedrilise kapsiidi kokkupanek tuumas (Holmgren et al., 2005). Enne viiruse vabanemist toimub virionide küpsemine kõige pindmise epiteelkihi surevates keratinotsüütides, milles väheneb mitokondriaalne oksüdatiivne fosforüülimine ja redutseeriv keskkond muutub oksüdeerivaks (Doorbar et al., 2012). See võimaldab disulfiid sildadel tekkida L1 valkude vahele, tänu millele tekivad stabiilsemad nakatumisvõimelised virionid (Buck et al., 2005; Finnen et al., 2003). Valmis partikkel sisaldab 360 molekuli L1 valku kokku seatud 72-ks kapsomeeriks ja väiksemal arvul L2 molekule nende vahel (Buck et al., 2008). Virionid vabanevad ülemistest epiteelkihtidest koos surnud keratinotsüütidega ja seda protsessi võib kontrollida E4 valk kogunedes amüloid kiududeks, mis lõhuvad keratiini struktuuri ja osalevad naha sarvkihi tekkel (McIntosh et al., 2008; Q. Wang et al., 2004; Brown et al., 2006).

1.5 Inimese papilloomiviiruste uurimine rakukultuuris

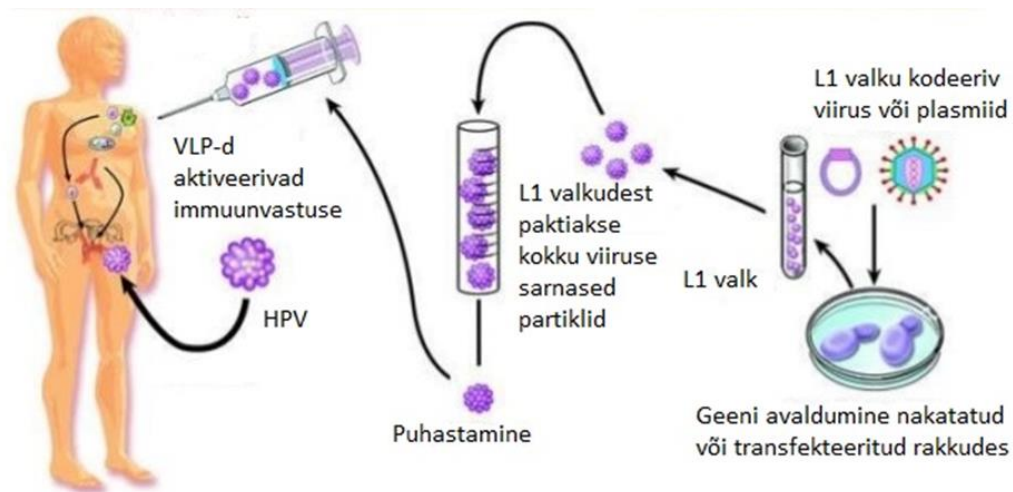
Papilloomiviirused vajavad oma eluetappideks kihelist diferentseeruvat epiteelkude ja seetõttu ei saa kasutada „pärisviiruseid“, et uurida neid enamikes rakukultuuris kasutatavates rakkudes. Enamustes laborites kasutatavates rakutüüpides ja rakuliinides ei toimi papilloomiviiruste replikatsiooni ega teki uusi virione. Üks võimalus papilloomiviiruste erinevate nakkusetappide uurimiseks ning suures hulgas nakatumisvõimeliste virionide saamiseks *in vitro* tingimustes on valmistada ja kasutada sünteetilisi viiruspartikleid. Nendeks võivad olla: viirus-sarnased partiklid (VLP), pseudovirionid (PsV) ja kvaasivirionid (QV). Kõigi nende papilloomiviiruste partiklite tegemiseks kasutatakse transfektsioonil ja/või infektsioonil põhinevaid meetodeid, kus ekspresseeritakse üle kapsiidivalgu L1 või L1 koos valguga L2. Partiklid erinevad üksteisest plasmidi põhise reportergeeni olemasolemise või puudumise poolest või papilloomiviiruse genoomi sisalduse poolest. Viirus-sarnased partiklid on seest tühjad. Pseudovirionid sisaldavad plasmidi põhiseid reportergeene. Kvaasivirionides on papilloomiviiruse genoom (Conway ja Meyers, 2009).

1.5.1 Viiruse-sarnased partiklid (VLP-d)

VLP-de valmistamiseks kasutatakse ekspressiooniplasmiide või viirusvektoreid, mis sisaldavad L1 või L1 ja L2 valku. Mõlema kapsiidivalgu kooskasutamine tõhustab VLP-de kokkupanekut ning selle tulemusena tekib stabiilsem partikkel (J. W. Wang ja Roden, 2013). Plasmiid transfekteeritakse või viirusvektoriga nakatatakse mõnda eukarüooti või prokarüooti rakutüüpi. Viirus-sarnaste partiklite valmistamiseks sobivad 293T (inimese embrüonaalsed neerurakud), BSC-1 (primaatide neerurakud), soolekepikese *E.coli*, pagaripärmi *S.cerevisiae* või putuka (*Spodoptera frugiperda*) Sf9 rakud (Kirnbauer et al., 1992; Hagensee et al., 1993; Rose et al., 1993; Belnap et al., 1996; Zhang et al., 1998; Chen et al., 2000; Querbies et al., 2006). Peale L1 ekspressiooni tekivad partiklid, mis säilitavad T=7 ikosaeedrilise sümmeetria ning pakivad ennast ise rakusiseselt kokku (Hagensee et al., 1994).

Esimese inimese papilloomiviiruse sarnase partikli tegemiseks kasutati Sf9 rakke ja HPV16 L1 avatud lugemisraami järjestust. L1 lõigati restriктаasidega ja klooniti kasutades bakuloviiruse transfer vektorit. Sf9 rakke nakatati rekombinantse bakuloviirusega ja kasvatati 72 tundi. Seejärel rakud lüüsi ja puhastati välja viiruspartiklid (Kirnbauer et al., 1992).

VLP-d on antigeenselt väga sarnased looduslike viiruste kapsiididega ja indutseerivad suurel hulgal tüüp-spetsiifiliste neutraliseerivate antikehade teket (Harper et al., 2004). Partiklite tegemiseks kasutatav valk L1 sisaldab immunodominantseid neutralisatsiooni epitoope (Lowy ja Schiller, 2006). Nendele seonduvad spetsiifilised antikehad, mis tekitavad tugevama immuunvastuse kui teiste antigeensete peptiididega seonduvad antikehad ja sel põhjusel algatakse immuunvastus ainult nende epitoopide vastu. Immunodominantseid neutralisatsiooni epitoope ära tundvad spetsiifilised antikehad takistavad viiruste rakku sisenemist. VLP-de vastu aktiveeritakse nii rakuline kui ka humoraalne immuunvastus. Tänu nendele omadustele on viiruse sarnased partiklid olnud aluseks tänapäeval kasutatavatele HPV vaktsiinide valmistamisele (joonis 4) (Lowy ja Schiller, 2006).



Joonis 4. HPV Viirus-sarnastest partiklitest vaktsiini valmistamine. HPV L1 valku kodeerivat ala sisaldav plasmiid transfecteeritakse või rekombinantse viirusega nakatatakse rakke. L1 avatud lugemisraamilt transkribeeritakse mRNA ja sellelt transleeritakse L1 valk. Rakkude sees pakitakse L1 valkudest kokku seest tühi kapsiid ehk viiruse-sarnase partikkel. Kokku pakitud partiklid eraldatakse rakkudest ja puhastatakse ning lisatakse vaktsiini. Vaktsiinis kutsus VLP esile nii rakulise kui ka humoraalse immuunvastuse, sest L1 valk sisaldab konformatsioonist sõltuvaid neutralisatsiooni epitoope. Kui vaktsineeritud inimene peaks kokku puutuma HPV viirusega, tekivad kehas vastavad antikehad, mis ei lase viirusel rakku siseneda. (Muudetud joonis Berzofsky et al., 2004)

Kasutusel on kahe firma: Merck ja GlaxoSmithKline poolt valmistatud HPV vaktsiinid, mis mõlemad on seest tühjad viirus-sarnased partiklid, mille valmistamiseks on kasutatud valku L1 (Lowy ja Schiller, 2006). Merck firma poolt toodetud vaktsiinide valmistamiseks kasutatakse pärmi rakke, GlaxoSmithKline vaktsiinid on toodetud putuka rakkudes rekombinantsete bakuloviiruste abil (Mao et al., 2006), (Harper et al., 2004). Merck firma poolt valmistatud vaktsiin Gardasil9 aitab kaitsta HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45, HPV52 ja HPV58 tüüpide eest („What is GARDASIL®9 (Human Papillomavirus 9-valent Vaccine, Recombinant)?“). Firma GlaxoSmithKline poolt toodetud vaktsiin Cervarix aitab kaitsta HPV16 ja HPV18 tüüpide eest, mis põhjustavad ligikaudu 70% emakakaelavähke („FDA Licensure of Bivalent Human Papillomavirus Vaccine (HPV2, Cervarix) for Use in Females and Updated HPV Vaccination Recommendations from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)“).

1.5.2 Pseudovirionid (PsV-d)

Pseudovirionide valmistamiseks on mitmeid võimalusi, aga tavaliselt kasutatakse transfectsiooniks koodon optimeeritud/modifitseeritud versioone L1 ja L2 geenidest koos reporter plasmiidiga. PsV tegemiseks kasutatakse 293FT või 293TT rakke, mis

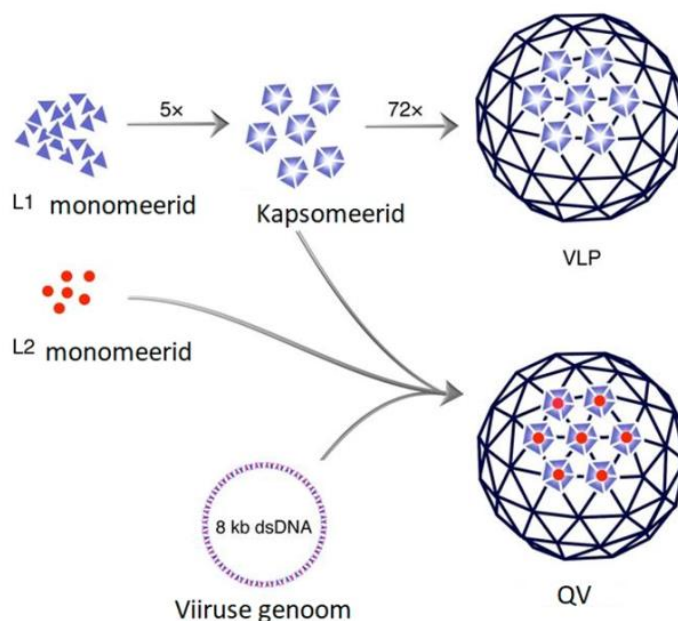
ekspresseerivad viiruse SV40 suurt T-antigeeni (Buck et al., 2005). Polüoomiviiruse SV40 suur T-antigeen on multifunktsionaalne valk, mis seondub spetsiifiliste DNA saitidega replikatsiooni origini juures, et viirus saaks alustada replikatsiooni (Fareed, 1980). Transfekteerides nendesse rakkudesse SV40 origini sisaldavat plasmidi, toimub plasmidi replikatsioon ja L1 ning L2 valkude ekspressioon ning saadakse kõrge koopiarv soovitud markergeeni sisaldavat plasmidi („293T cells“). PsV-d pakivad ennast ise rakusiseselt kokku. Sellele järgneb küpsemise etapp, mis muudab virionid stabiilsemaks ja struktuurselt sarnasemaks looduslike viirustega (Buck et al., 2005). See etapp teostatakse hoides nakatatud või transfekteeritud rakkudest välja puhastatud pseudovirione 24 tundi 37 kraadi juures (Conway ja Meyers, 2009). Tavaliselt puhastatakse valmis virionid iodiksanoooliga gradient-tsentrifuugimisel ehk Optiprep meetodil. Tänu sellele meetodile on võimalik lühikese ajaga toota suur hulk pseudovirione. PsV-d on struktuurselt väga sarnased looduslike viirustega ka elektronmikroskoobi all ning neil on sarnased immunoreaktiivsed profiilid konformatsioonist sõltuvate neutraliseerivate antikehade vastu ja sellest järeldatakse, et pseudovirionides on säilinud paljud kui mitte kõik konformatsioonilised epitoobid (Buck et al., 2008; Conway ja Meyers, 2009; Day et al., 2003; Embers et al., 2004; Gambhira et al., 2007; Yang et al., 2005).

Pseudovirione kasutatakse peamiselt struktuuri ja neutralisatsiooni analüüsideks ja papilloomiviiruse rakku sisenemise mehhanismide uurimiseks. Neid on võimalik kasutada geeniteraapias terapeutiliste DNA vektorite kandjana või ka DNA vaktsiini kohale toimetamiseks, et ennetada või kontrollida infektsiooni ja/või vähkkasvajad (Ma et al., 2011).

1.5.3 Kvaasivirionid (QV-d)

Kvaasivirionide valmistamine on sarnane pseudovirionide tegemisega, aga lisaks L1 ja L2 koodon optimeeritud ekspressiooni plasmiidiga transfekteeritakse 293FT või 293TT rakkudesse papilloomiviiruse retsirkulariseeritud genoom (joonis 5) (Pyeon et al., 2005). Erinevalt teistest papilloomiviiruste sünteetilisest partiklitest on kvaasivirionidel võime nakatada rakke nii *in vivo* kui *in vitro* tingimustes (Culp et al., 2006b). Loomkatsed soojänese papilloomiviiruse genoomi sisaldavate kvaasivirionidega on näidanud, et viirusnakkus on sarnane „pärisviirusega“, nakatumisega kaasneb papilloomide teke ja QV-sid neutraliseerivad anti-L1 antikehad (Culp ja Christensen, 2004; Pyeon et al., 2005). Selle põhjal arvatakse, et QV-d on peaaegu identsed looduslike viirustega (Conway ja Meyers, 2009).

Kvaasivirione saab kasutada HPV replikatsiooni, nakatamise etappide ning vaktsiinide ja ravimite arendamise uurimiseks (Pyeon et al., 2005).



Joonis 5. Skeem viirus-sarnaste partiklite ja kvaasivirionide valmimisest. Kõigepealt tekivad L1 valkudest kapsomeerid ning seejärel pakivad need ennast ise rakus sees viiruse kapsiidiks. Kui lisada L1 valkudele L2 valke on võimalik saada stabiilsem ja naturaalse viirusega sarnasem ümbris. Transfekteerides 293T liini rakke plasmiididega, mis kodeerivad L1 ja L2 valke ning HPV genoomi, pakitakse rakkude sees kokku loomulike viirustega sarnased kvaasivirionid. (Muudetud joonis Lowy, 2016)

1.5.4 Naturaalsed viirused

Looduslike viiruste elutsüklil sõltub diferentseeruvast epiteelkoest ja sellepärast on neid võimalik sünteesida ainult loomuliku infektsiooni käigus või organtüüpi parvkultuuris (Meyers et al., 1992; M A Ozbun ja Meyers., 1997; McLaughlin-Drubin et al., 2003; Gu et al., 2004; McLaughlin-Drubin ja Meyers, 2005b). Organtüüpi epiteelkoe parvkultuurid on loomuliku epiteelkoega sarnased koekultuurid, milles toimuvad kõik keratinotsüütide diferentseerumise etapid, kuna rakke kasvatatakse kihiliselt kollageeni geelil õhk-vedelik piirpinnal (Andrei et al., 2005). Nende valmistamiseks kasutatakse HPV genoomi sisaldavaid rakuliine, mis on saadud kas biopsia käigus või tehtud transfekteerides keratinotsüüte HPV genoomse DNA-ga (McLaughlin-Drubin ja Meyers, 2005b). Organtüüpi parvkultuurides toimuvad kõik kõrgeriskiga papilloomiviiruste infektsiooni etapid, aga nende tegemine on kallim ja ajamahukam kui sünteetiliste viiruste partiklite valmistamine.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö põhieesmärk on valmistada nakatamisvõimelisi HPV genoomi sisaldavaid kvaasivirione, kasutades selleks HPV *minicircle* genoomi ja HPV16 L1 ning L2 valke kodeerivat p16shell plasmidi. Lisaks sooviti teada, kas samal meetodil saaks valmistada HPV18-ne varajasi konstrukte sisaldavaid kvaasivirione (HPV16-H18E) papilloomiviiruse replikatsiooni uurimiseks ning pEGFPN3 plasmidi sisaldavaid pseudovirione (HPV16-GFP). Valmistatud partiklite nakatamisvõimet hinnati U2OS ja 293FT liini rakkudes.

Töö tegemiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. Kontrollida p16shell plasmidi õigsust.
2. Konstrueerida HPV16-H18E, HPV16-H11 ja HPV16-GFP DNA-d sisaldavad viirused 293FT rakkudes kasutades HPV11 ja HPV18E *minicircle* genoomide ning pEGFPN3 plasmidi pakkimiseks kapsiidi p16shell plasmidi.
3. Hinnata vastavate sünteetiliste viiruste nakatamisvõimet 293FT rakkudes 48 tundi peale nakatamist.
4. Hinnata viiruse HPV16-GFP 293FT rakkude nakatamisvõimet erinevates lahjendustes.
5. Hinnata vastavate sünteetiliste viiruste nakatamisvõimet U2OS rakkudes 72 h, 96 h, 120 h ja 144 h peale nakatamist.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid

p16shell on 10827 aluspaarist koosnev plasmiid, mis ekspresseerib HPV16 L1 ja L2 valku. Plasmiid saadi Dr. John Schillerilt (Addgene plasmiid # 37320). Plasmidi kasutati töös viirus-partiklite kokku pakkimiseks. P16shell plasmiidikaart on välja toodud lisas 1.

pEGFPN3 on 4729 aluspaarist koosnev plasmiid, mis sisaldab GFP-d (*green fluorescent protein*) ekspresseerivat järjestust. Plasmiid saadi juhendajalt. Töös kasutati plasmidi fluorestsentsmikroskoobi all nähtavate pseudovirionide valmistamiseks. pEGFPN3 plasmiidikaart on välja toodud lisas 2.

HPV11 *minicircle* (mc) genoom on HPV11 viiruse täispikka genoomi sisaldav plasmiid. HPV11 *minicircle* plasmiid saadi juhendajalt. Töös kasutati plasmidi HPV11 genoomi sisaldavate kvaasivirionide valmistamiseks. HPV11 mc plasmiidikaart on välja toodud lisas 3.

HPV18E *minicircle* genoom on viiruse HPV18 varajasi avatud lugemisraame sisaldav plasmiid. Plasmiid saadi juhendajalt. Töös kasutati plasmidi HPV18-ne varajase valke kodeeriva kvaasivirioni tegemiseks. HPV18E mc plasmiidikaart on välja toodud lisas 4.

2.2.2 Rakuliinid ja söötmed

293FT rakud on SV40 viiruse suure T antigeeniga transformeeritud inimese embrüonaalsed neerurakud. 293FT rakkude kasvatamiseks kasutati DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) söödet, kuhu lisati 10% FCS-i (veise loote seerumi) ning 1% penitsilliin-streptomütsiini, kui pole öeldud teisiti.

U2OS rakuliini rakud pärinevad inimese osteosarkoomist. U2OS rakke kasvati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, mis sisaldas 10% FCS-i ning 1% penitsilliin-streptomütsiini

DH5-alfa bakterirakud on transformatsiooni efektiivsuse tõstmiseks konstrueeritud E.coli rakud, mida kasutatakse laboris DNA kloonimiseks. Baktereid kasvatati LB söötmes (*Lysogeny broth*).

Kõikides eksperimentides kasvatati rakke inkubaatoris 37°C juures ja CO₂ sisaldusel 5%.

2.2.3 Plasmidi p16shell transformatsioon ja puhastamine

2.2.3.1 Transformatsioon

Töö esimeseks ülesandeks oli puhastada ja kontrollida plasmidi p16shell õigsust. Selleks transformeeriti plasmiid bakterirakkudesse, puhastati DNA ja teostati restriksioonanalüüs. Transformatsiooni teostamiseks segati kokku plasmiidne DNA (0,1 µg) ja 60 µl DH5-alfa kompetentseid bakterirakke ning hoiti segu 10 minutit jääl. Seejärel teostati rakkudele kuumašokk tõstes segu jäält 2,5 minutiks 37°C juurde. Peale seda lisati segule 500 µl LB

söödet ja loksutati segu 40 minutit 37°C juures. Viimaks külvati rakud ampitsilliini sisaldavale söötmele ja kasvatati üleöö 37°C juures. Järgmisel päeval külvati kaks kolooniat söötmetassilt kumbki 3 ml-sse LB vedelsöötmesse, mis sisaldas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Rakke kasvatati päeva jooksul 37°C juures ja öhtul kanti 500 µl rakususpensiooni 100 ml söötmesse, mis sisaldas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Kultuuri kasvatati üleöö 37°C juures.

2.2.3.2 Plasmidi puhastamine ja kontrollimine

Eelmisel päeval vedelsöötmesse külvatud kolooniate ja söötme segust võeti mõlemat kultuuri 100 ml. Plasmid p16sheLL puhastati bakterirakkudest Nucleobond[®]Xtra *plasmid purification* kitiga vastavalt tootjapoolsele juhendile. Puhas DNA suspendeeriti 100 ml TE-s (10mM Tris-HCl, pH7,5; 1 mM EDTA). Plasmidse DNA kontsentratsioon mõõdeti kasutades Nanodrop ND-1000 UV spektromeetrit. Plasmiidide kontsentratsioonid olid 3 mg/ml ja 2,8 mg/ml.

Plasmidi õigsuse kontrollimiseks teostati restriksioonianalüüs. Eraldatud DNA lõigati erinevate restriктаasidega: PvuI ja Eco32I, XbaI ja KspAI, Acc65I. Restriksioonanalüüsil kasutati reaktsiooni kohta 0,5 µg DNA-d. Restriksioon toimus 2 tundi 37°C juures. Restriksioonisegule lisati 6xOG (50% glütserool, 0,25% OrangeG) värvi ja geelelektroforees teostati 0,8% TAE (tris-atsetaat-EDTA) agarosgeelil, mis sisaldas 0,2 µg/ml etiidiumbromiidi, voolutugevusel 60 mA.

2.2.3.3 P16shell ja HPV11, HPV18E ning pEGFPN3 plasmiidide transfektsioon 293FT liini rakkudesse.

Enne transfektsiooni kasvatati üheksa 100 mm läbimõõduga Petri tassi 293FT liini rakke, kuni rakud olid saavutanud ligikaudu 90%-lise konfluentsuse igal tassil.

Transfektsiooniks valmistati 3 erinevat segu, mis sisaldasid ühe Petri tassi rakkude kohta:

1. 500 µl DMEM söödet, p16shell plasmiidne DNA (5 µg), HPV18E (5 µg) ja 25 µl PEI (polüetüleenimiin, 1mg/ml).
2. 500 µl DMEM söödet, p16shell plasmiidne DNA (5 µg), HPV11 (5 µg) ja 25 µl PEI (1mg/ml).

3. 500 µl DMEM söödet, p16shell plasmiidne DNA (5 µg), pEGFPN3 (5 µg) ja 25 µl PEI (1mg/ml).

Ette kasvatatud rakkudel eemaldati sööde ja neid pesti 1 kord PBS-ga (*phosphate-buffered saline*). Igale tassile lisati 7 ml puhast DMEM söödet (sööde ilma FCS seerumi ja antibiootikumideta) ning seejärel tilgutati Petri tassidele transfektsioonisegu. Kolmest valmis tehtud segust tilgutati igat ühte kolmele Petri tassile. Rakud asetati inkubaatorisse ja kahe tunni pärast lisati rakkudele 7 ml DMEM söödet, mis sisaldas 10% FCS seerumit, et seerumi lõppkontsentratsioon oleks 5% Petri tassi kohta. Rakke kasvatati inkubaatoris 37°C juures ~48 tundi.

2.2.4 Rakkude lüüs

Rakkude lüüsi, soolaga ekstraheerimise ja viiruste puhastamise etappides on kasutatud USA riikliku vähiinstituudi (*National Cancer Institute*) poolt 2015 aastal avaldatud protokoll: *Production of Papillomaviral Vectors (Pseudoviruses)*, kuid selles on tehtud mitmeid muudatusi. Peale ~48 tundi lüüsi transfekteritud rakud. Esmalt eemaldati sööde, pesti rakud PBS-ga ja lisati 2 ml trüpsiini igale Petri tassile. Oodati 3-5 minutit ja seejärel koguti rakud tuubidesse, kuhu oli eelnevalt pandud 30 ml söödet DMEM+10%FCS. Tuube tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor A-4-81) 5 minutit, 1500 rpm, 22°C juures. Eemaldati supernatant ja lisati sademele 10 ml PBS-i, mis sisaldas 9,5 mM Mg^{2+} ning sade suspendeeriti. Tuube tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor A-4-81) 5 minutit, 1500 rpm, 22°C juures. Eemaldati supernatant ja visuaalselt hinnati sademe ruumala. Lisati 1.4 ruumala PBS-i, mis sisaldas 9,5 mM Mg^{2+} . Segu segati vorteksil. Lisati 1/20 ruumala 10% TritonX-100. Rakud suspendeeriti ja iga segu jagati kahe 1,5 ml eppendorffi vahel. Igasse tuubi lisati 12,5 µl 1M ammoonium sulfaati (ph 9). Rakulüsaati inkubeeriti 24 tundi 37°C juures. Peale seda säilitati viiruse preparaate -70°C juures.

2.2.5 Soolaga ekstraheerimine ja viiruste puhastamine

Esialgu valiti puhastamiseks ainult HPV16-GFP ja HPV16-H18E viirused. Valmis viiruse preparaate hoiti 5 minutit jääl. Peale seda lisati 0,17 ruumala filtreeritud 5M NaCl. Preparaate inkubeeriti 10 minutit jääl. Eppendorffe koos preparaatidega tsentrifuugiti (Heraeus Biofuge

pico, Microlitre rootor 24 x 1.5/2 ml) 5 minutit, 5000 rpm. Supernatant lisati uutesse tuubidesse, igasse tuubi 30 µl → fraktsioon nr 1. Sade suspendeeriti 2x ruumalas PBS-s, mis sisaldas 0,8M NaCl. Tsentrifugeeriti 10 minutit, pööratel 5000 rpm. Supernatant jagati 30 µl kaupa väiksematesse tuubidesse → fraktsioon nr 2.

2.2.6 Nakatamine

2.2.6.1 293FT rakkude nakatamine

Enne nakatamist kasvatati 293FT rakke 1 ööpäev DMEM+10% FCS söötmel, seejärel trüpsiniseeriti rakud 45 ml-sse DMEM+10% FCS söötmesse ning tsentrifugeeriti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor A-4-81) 5 minutit, 5000 rpm. Rakusade võeti üles 2 ml-s söötmes. Rakkude loendamiseks segati 20 µl rakke ja 20 µl trüpaan-sinist ja kasutati Invitrogen automaatset rakulugejat. Peale seda külvati rakud 60 mm läbimõõduga plaatidele, 800 000 rakku ühe plaadi kohta, kokku 6 plaati. Rakke kasvasi ~24 tundi inkubaatoris 37°C juures, 3 ml-s söötmes. Seejärel nakatati rakke HPV16-GFP, HPV16-H18E ja HPV16-H11 viirustega kahes lahjenduses: 1:1000 ja 1:5000, tilgutades eelnevalt valmistatud viiruse preparaate neile peale. HPV16-GFP ja HPV16-18E preparaatidega nakatades kasutati fraktsioon nr 2-e. Järgmisel päeval lisati plaatidele 1 ml söödet.

HPV16-GFP viiruse nakatamisvõime hindamiseks erinevates lahjendustes nakatati kolm 120 mm läbimõõduga tassi rakke puhastamata HPV16-GFP viirusega kolmes erinevas lahjenduses: 1:500, 1:5000 ja 1:50000. Selleks külvati kolmele tassile 293FT liini rakke ja kasvatati neid kuni rakud olid saavutanud ligikaudu 90%-lise konfluentsuse. Seejärel nakatati rakke tilgutades vastavas lahjenduses viirusepreparaati rakkudele.

2.2.6.2 U2OS rakkude nakatamine

U2OS rakke kasvatati 1 ööpäev DMEM+10% FCS söötmel, seejärel trüpsiniseeriti rakud 45 ml-sse DMEM+10% FCS söötmesse ning tsentrifugeeriti (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor A-4-81) 5 minutit, 5000 rpm. Rakusade võeti üles 2 ml-s söötmes. Rakkude loendamiseks segati 20 µl rakke ja 20 µl trüpaan sinist ning kasutati Invitrogen automaatset rakulugejat. Seejärel jagati rakud 60 mm plaatidele, 800 000 rakku plaadi kohta, kokku 12 plaati. Rakkudel lasti ~24 tundi inkubaatoris 37°C juures 3 ml-s söötmes kasvada. Järgmiseks

nakatati 4 plaati rakke HPV16-GFP viiruse preparaadiga lahjenduses 1:1000, 4 plaati rakke HPV16-H18E viiruse preparaadiga lahjenduses 1:1000 ning 4 plaati rakke HPV16-H11 viiruse preparaatidega lahjenduses 1:1000 tilgutades 3µl viiruse preparaati söötmega tassile. Iga viiruse preparaadi kohta võeti neli ajapunkti: 72 h, 96 h, 120 h ja 144 h. Ajapunkti täis saamisel alustati vastavalt plaadilt totaalse DNA eraldamist.

2.2.7 Fluorestsentsmikroskoopia

Peale nakatamist vaadeli HPV16-GFP-ga nakatatud rakke GFP signaali detekteerimiseks 100 kordsel suurendusel Nikon Eclipse TS100 fluorestsentsmikroskoobiga. 48 tunni möödudes pildistati lahjendustes 1:500, 1:5000 ja 1:50000 nakatatud 293FT liini rakke nähtavas valguses kasutades faaskontrast objektiivi ja fluorestsentsvalguses kasutades GFP bandpass filtrit.

2.2.8 Totaalse DNA eraldamine rakkudest ja viiruse preparaatidest

Totaalne DNA eraldati nii nakatatud rakkudest kui ka HPV16-GFP, HPV16-H11 ja HPV16-H18E viiruse preparaatidest. Totaalse DNA eraldamiseks rakkudest pesti rakud 1x PBS-ga ning 60 mm plaadile lisati 0,5 ml ProtK lüüsi puhvrit (100 mM Tris-Cl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.2% SDS), kuhu lisati ensüümi proteinaas K lõppkontsentratsioon 0,1 mg/ml. Rakud lüüsi toatemperatuuril 10-15 minutit aega ajalt plaate kallutades. Lüsaadi viskoossust vähendati kasutades lahuse pumpamist läbi insuliini süstla (nõel 23G) ning seejärel koguti lüsaat eppendorffi ja inkubeeriti ligikaudu 18 tundi 56°C juures. Viiruse preparaatidest DNA eraldamiseks võeti 100 µl igat preparaati ning lisati nendele 0,5 ml ProtK lüüsipuhvrit, mis sisaldas ensüümi proteinaas K lõppkontsentratsioon 0,1 mg/ml ja segu inkubeeriti sama moodi kui rakkude lüsaati. Järgmiseks lisati kõikidele lüsaatidele võrdne maht fenool/kloroformi ning segu segati vorteksil ja tsentrifuugiti (Heraeus Biofuge pico, Microtitre rootor 24 x 1.5/2 ml) 3 minutit, pööretel 13000 rpm. Vesifaas kanti uude tuubi ning lisati kahekordne maht 96% etanooli ja segati vorteksil. Seejärel hoiti segu 30 minutit -20°C juures. Segu tsentrifuugiti (MicroCL 21R Microcentrifuge, 24 x 1.5/2.0mL rootor) 10 minutit, pööretel 12000 rpm, 4°C juures. Eemaldati supernatant ning sade pesti 250 µl 75%-lise etanooliga. Segu tsentrifuugiti (MicroCL 21R Microcentrifuge, 24 x 1.5/2.0mL rootor) 5 minutit, pööretel 12000 rpm, 4°C juures. Supernatant eemaldati ning sadet kuivatati

toatemperatuuril. Seejärel lahustati sade 20 µl TE puhvris (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA), kuhu oli lisatud Rnaasi lõppkontsentratsiooniga 10 µg/ml. Segu hoiti 20 minutit 65°C juures ja säilitati -20°C juures.

2.2.9 Southern blot

2.2.9.1 Restriksioon

Southern bloti teostamiseks võeti 5 µg eraldatud DNA-d ja lõigati seda erinevate ensüümidega. HPV16-H18E-ga nakatatud rakkudest eraldatud DNA-d ja HPV16-H18E viirusest eraldatud DNA-d lõigati BglI-ga. Viiruse preparaate HPV16-H11 ja HPV16-H18E ja nendega nakatatud rakke lõigati ensüümiga HindIII. Restriksiooni toimumiseks hoiti segusid 37°C juures ~12 tundi.

2.2.9.2 Geelelektroforees ja DNA ülekanne filtrile

Seejärel kanti lõigatud DNA-d 0,8% TAE agarosgeelile, mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µl/ml. Geelelektroforeesi alustati 60 voldiga ja ~20 minuti pärast tõsteti pinget 100 voldini. Geelelektroforees kestis ligikaudu 2 tundi. Seejärel loksutati geeli 45 minutit denaturatsioonilahuses SOLA (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl). Geel loputati destilleeritud veega ja siis loksutati seda 30 minutit neutralisatsioonilahuses SOLB (1 M Tris pH-7,4, 1,5 M NaCl). Lõigati välja geeli suurused (11,5x15 cm) nailonfilter ja 2 filterpaberi tükki. Klaasist vanni valati 1 liiter 10xSSC-d (1,5 M NaCl, 150 mM Na₃C₆H₅O₇), asetati peale klaas ja kahekordne 10xSSC-s märjatud filterpaber ning rulliti välja õhumullid. Paberi peale asetati tagurpidi geel. Geeli peale asetati nailonfilter, rulliti välja õhumullid, järgmiseks kaks filterpaberit, pakk salvrätte, klaas ja raskus. DNA ülekanne geelilt filtrile toimus ligikaudu 18 tundi. Järgmisel päeval kuivatati nailonfilter, teostati DNA ristseoseline sidumine filtrile UV Stratalinker 1800 aparaadiga.

2.2.10 Hübridisatsiooniproovide valmistamine

Hübridisatsiooniproovide mallidena (template) kasutati restriksioonianalüüsiga lineariseeritud HPV18 ja HPV11 täispikki genoome ning pEGFPN3 plasmidi nukleotiidset järjestust. Mallid saadi juhendajalt. Proovi valmistamiseks segati kokku 200 ng vastavat DNAd, 15 µl vett ja 5 µl 5x puhvrit/praimereid. Segu inkubeeriti 5 minutit 100°C juures. Seejärel asetati eppendorffid jääle. Tsentrifuugiti (Heraeus Biofuge pico, Microtitre rootor 24x1.5/2 ml) 1 minut, pöõretel 10000 rpm. Igasse eppendorffi lisati 1,5 µl Cmixi (dNTP-d v.a. dCTP); 3µl alfaP32dCTP; 0,5 µl Klenowi ensüümi. Inkubeeriti 15 minutit 37 kraadi juures, siis lisati 2 µl dNTP mixi. Proove kuumutati 7 minutit 100°C juures ja seejärel jahutati jääl.

2.2.11 Hübridisatsioon

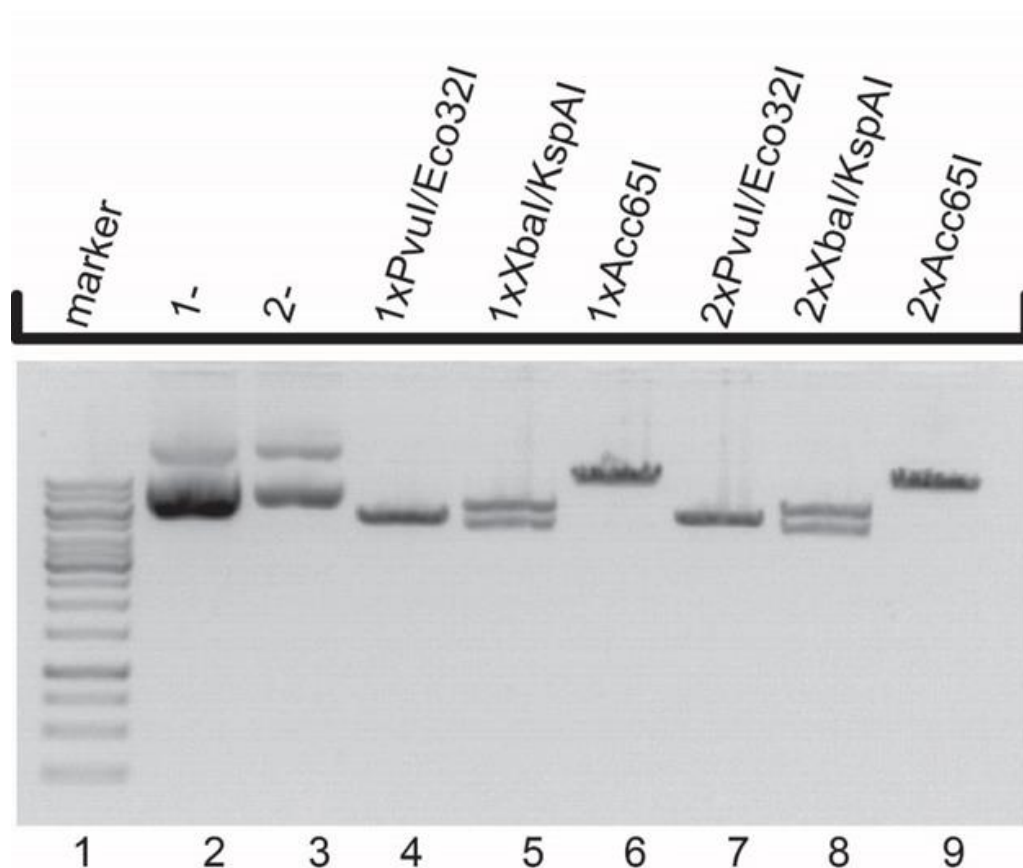
Esiteks pandi käima pre-hübridisatsioon hübridisatsiooniproovi ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks nailonfiltrile, inkubeerides filtreid hübridisatsioonilahuses (1 mM EDTA; 0,5 M phosphate buffer pH 7,2; 7% SDS) 1 tund, 65°C juures hübridisatsiooniahjus. Seejärel valati pre-hübridisatsioonilahust vähemaks, kuni hübridisatsioonipudelisse jäi 30 ml vedelikku ning siis lisati hübridisatsiooniproovid lahusele. Hübridisatsioon toimus ~20 tundi 65 kraadi juures hübridisatsiooniahjus. Järgmisel päeval peatati hübridisatsioon valades filtrite pealt ära hübridisatsioonilahus ning filtrid pesti. Esmalt pesti filtreid 15 minutit lahus 1-ga (2xSSC, 0,1% SDS), seejärel 10 minutit lahus 2-ga (1xSSC, 0,1% SDS) ja viimaseks 15 minutit lahus 3-ga (0,1xSSC, 0,1% SDS).

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 p16shell plasmidi õigsuse kontroll

Plasmiid p16Shell saadi Addgene plasmiidide kollektsioonist. Tihti on juhtunud, et sealsest kollektsioonist saadud DNA-d on osutunud vigasteks. Seega teostati p16Shell plasmidi õigsuse kontrollimiseks restriksioonianalüüs. Selleks lõigati puhastatud plasmidi erinevate restriктаasidega. Restriктаasidega PvuI ja Eco32I lõigates on oodatud DNA fragmentide pikkused 5256 ja 5571 bp, restriктаasidega XbaI ja KspAI lõigates on oodatud fragmentide pikkused 4730 ja 6097 bp ning restriктаas Acc65I lõikab plasmidi üks kord, mille tulemuseks on 10827 bp pikkune lineaarne DNA. Restriksioonisegud ja mõlemad lõikamata puhastatud

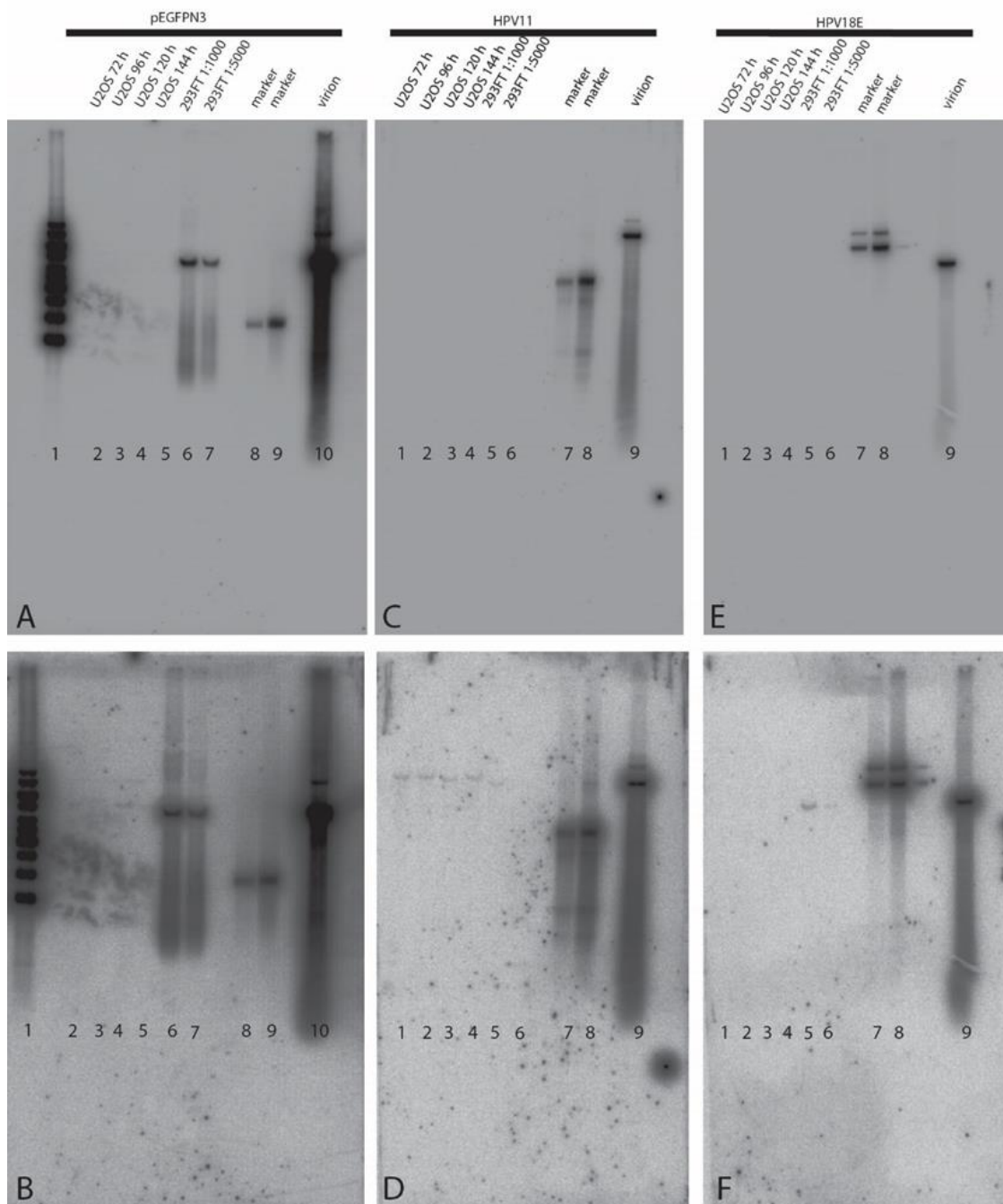
plasmiidse DNA-d analüüsi 0,8% agarosgeelil TAE puhvis. Gelelektroforeesi tulemusena on näha, et mõlemad puhastatud plasmiidid on sama suured ja lõikuvad restriктаasidega lõigates sarnaselt, millest võib järeldada, et mõlemast bakterikolooniast puhastatud plasmiidid on samad. Lõikamata plasmidi puhul on signaal plasmiid ühest natukene tugevam kui plasmiid kahest ja see näitab, et see plasmiid sisaldab rohkem DNA-d, aga see on arvatavasti põhjustatud pipeteerimise veast (rajad 2 ja 3). Ka on pildil näha, et radadel 4 ja 7 on olemas 5256 ja 5571 bp pikkused DNA fragmendid, mis jooksevad antud agarosi % juures sarnaselt. Restriктаasidega XbaI ja KspAI lõigates olid oodatud fragmentide pikkused 4730 ja 6097 bp ja need mõlemad on näha ka radadel 5 ja 8. Radadel 6 ja 9 on näha Acc65I poolt genereeritud lineaarne 10827 bp pikkune DNA. Plasmidse DNA restriktiioonianalüüsi tulemused vastavad oodatud tulemustele ja järelikult on tegu õige plasmiidiga.



Joonis 6. Plasmidi p16shell õigsuse kontroll. 1. rajal on suurusmarker. 2. ja 3. rajal on lõikamata puhastatud plasmiidid, mõlemat plasmiidset DNA-d pandi geelile 0,5 µg. Plasmiid 1-e algkontsentratsioon oli 3,0 mg/ml ja plasmiid 2-e algkontsentratsioon oli 2,8 mg/ml. Rajad 4, 5 ja 6 näitavad restriктаasidega PvuI ja Eco32I, XbaI/KspAI ning Acc65I lõigatud plasmiid 1-e DNA fragmente. Rajad 7, 8 ja 9 näitavad restriктаasidega PvuI ja Eco32I, XbaI/KspAI ning Acc65I lõigatud plasmiid 2-e DNA fragmente.

2.3.2 Southern blot analüüs

Eksperimentaalse osa järgmisteks ülesanneteks olid konstrueerida HPV16-GFP, HPV16-H11 ja HPV16-H18E viiruse partiklid ning hinnata nende nakatamisvõimet 293FT rakkudes 48 tundi peale nakatamist ja U2OS rakkudes 72, 96, 120, 144 tundi peale nakatamist. Viiruste konstrueerimiseks kasvatati 293FT liini rakke ja transfecteeriti neisse p16shell ja HPV11/HPV18E/pEGFPN3 plasmiidid kasutades PEI vahendatud transfectioonimeetodit. Rakkude sees toimub vastavate plasmiididelt geeni ekspressioon ning pakitakse kokku HPV genoomi sisaldavad kvaasivirionid või GFP-d ekspresseerivad pseudovirionid. 48 tunni pärast lüüsi rakud ja puhastati välja sünteetilised viirused. Seejärel hinnati valmistatud viiruste nakatamisvõimet. Selleks kasvatati 293FT ja U2OS rakke. 293FT rakke nakatati kahes lahjenduses: 1:1000 ja 1:5000, tilgutades viiruse preparaati rakkude peal olevasse söötmesse. U2OS rakke nakatati lahjenduses 1:1000. 48 tundi peale nakatamist ilmnes HPV16-GFP-ga nakatatud 293FT rakkudes GFP ekspressioon fluorestsentsmikroskoobi all. Valmistatud virionidest ja nakatatud rakkudest eraldati vastavatel ajapunktidel genoomi DNA, eraldatud DNA-d lineariseeriti restriktasididega ning analüüsiti southern blot meetodil.



Joonis 7. Southern blot analüüsi tulemused. Vasakul 1. reas on suurusmarker. U2OS rakke viirustega nakatades võeti 4 ajapunkti: 72 h, 96 h, 120 h ja 144 h. FT293 rakke nakatati kahes lahjenduses: 1:1000 ja 1:5000, iga pildi viimases reas on viirus preparaadist eraldatud DNA. Pildil A ja B on viirusega HPV-16-GFP nakatatud rakkudest eraldatud lineariseeritud DNA, viiruse GFP järjestust kodeeriva ala, lineariseerimata markerid ja puhastatud viiruse preparaatidest eraldatud ja lineariseeritud DNA. Pildil C ja D on HPV16-H11 viirusega nakatatud rakkudest eraldatud lineariseeritud DNA, HPV11 lineariseerimata järjestused markeritena ja valmisatud viirus preparaadist eraldatud DNA. Pildil E ja F on viirusega HPV16-H18E nakatatud rakkudest eraldatud ja lineariseeritud DNA, HPV18 DNA markeritena ja viiruse preparaatidest eraldatud ja lineariseeritud DNA.

Southern bloti analüüsi tulemused on esitatud joonisel 7. Tulemustest on näha, et kõigist kolmest viiruse preparaadist eraldatud DNA, sisaldab vastava viiruse või GFP-d kodeeriva

plasmidi DNA-d. HPV16-GFP viirusest eraldatud lineariseeritud DNA on näha pildidel A ja B rajal 10. HPV16-H11 viirusest eraldatud lineariseeritud DNA on näha pildidel C ja D rajal 9. HPV16-H18E viirusest eraldatud lineariseeritud DNA on pildidel E ja F rajal 9. Kõige intensiivsem oli signaal HPV16-GFP viiruse puhul, mis oli ka oodatav, kuna pEGFPN3 plasmid sisaldab SV40 replikatsiooni ori ja seega ta replitseerub 293FT rakkudes ning seega on plasmidi hulk suurem kui HPV18E ja HPV11 plasmididel. Viiruse preparaate õigsuse kontrollimiseks kasutati ka markereid, milledeks olid 100 ja 500 pg pEGFPN3 plasmidset DNA-d (pildil A ja B rajad 8 ning 9), 100 ja 500 pg HPV11 viiruse täisgenoomi (pildil C ja D rajad 7 ning 8) ja 100 ja 500 pg HPV18 viiruse täisgenoomi (pildil E ja F rajad 7 ja 8). Markeriteks kasutatav DNA oli lineariseerimata, ning seega ei jooksnud ta geelis sarnaselt lineariseeritud uuritavale DNA-le. Sel põhjusel ei sobi kasutatud markerid viiruspreparaate õigsuse kontrollimiseks. Arvestades neid tulemusi võib järeldada, et viiruste HPV16-GFP, HPV16-H11 ja HPV16-H18E konstrueerimine õnnestus.

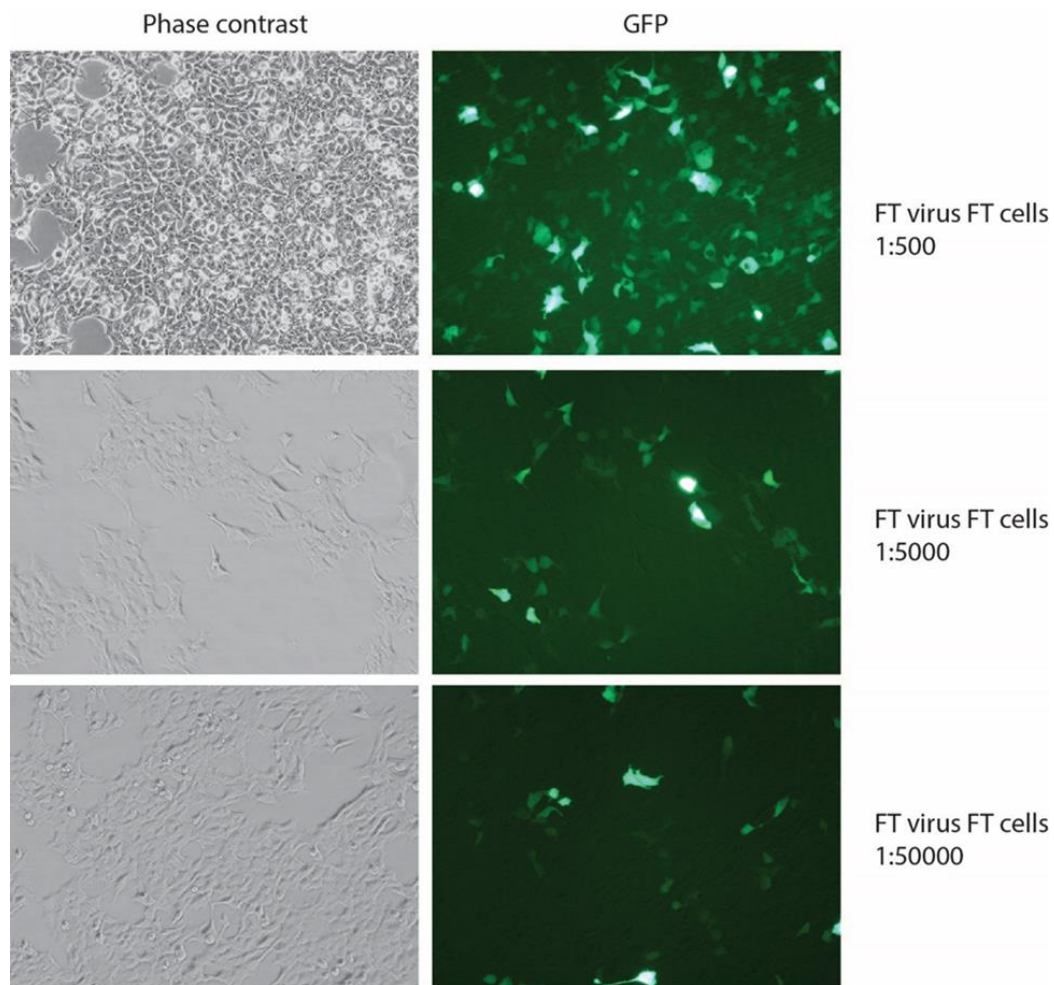
Nakatatud 293FT rakkudest eraldatud DNA analüüsilt on näha, et 48 tundi peale nakatamist oli võimalik selgelt rakkudes detekteerida pEGFPN3 plasmidi ning plasmidi hulk oli suurem lahjenduses 1:1000 kui 1:5000 (pildil A ja B rajad 6 ning 7). Southern blot analüüsi pildilt nõrgemaid signaale otsides leiti, et ka HPV16-H18E ning HPV16-HPV11 viiruste DNA-d on võimalik tuvastada 293FT rakkudes (pildil D ja F rajad 5 ja 6). Tulemus, et HPV16-GFP viirusega nakatamisel oli rakus oleva pseudoviiruse DNA hulk palju suurem kui HPV16-H11 ja HPV16-H18E viirusega nakatamise puhul oli oodatav kahel põhjusel. Esiteks näghti juba viiruspartikleid analüüsides seda, et HPV16-GFP viirused sisaldasid rohkem uuritavat DNAd mikrogrammi DNA kohta kui HPV16-H11 ja HPV16-H18E viirused. Teiseks, pEGFPN3 plasmid on võimeline 293FT rakkudes replitseeruma ning seega seda paljundatakse. HPV11 ja HPV18E genoomid ei ole üldiselt 293 rakkudes võimelised replitseeruma ning seega pärineb signaal viirusega nakatatud DNA-st. Tulemustest järeldub, et kõik konstrueeritud viirused olid nakatamisvõimelised.

Nakatatud U2OS rakkudest eraldatud DNA analüüsist selgus, et U2OS rakkudes oli viiruste DNA-d väga vähe ja selleks, et seda näha peab joonisel 8 otsima nõrkasid signaale autoradiograafia pikemal eksponeerimisel (pildid B, D ja F). HPV16-GFP viirusest pärit pEGFPN3 plasmidi on võimalik tuvastada U2OS rakkudes ajapunktidel 72 h, 96 h ja 120 h (pildil B rajad 2, 3 ja 4) ning ta kaob 144 tundi peale nakatamist (pilt B, rada 5). Pildil D radadel 1, 2, 3 ja 4 on näha, et HPV11 DNA on tuvastatav 72, 96, 120 ja 144 tundi peale nakatamist. Pildil F on näha, et rajad 1, 2, 3 ja 4 on tühjad, mis tähendab, et HPV18E DNA-d ei õnnestunud tuvastada U2OS rakkudes.

U2OS rakkudes teostatud analüüs näitas, et kõige selgemalt oli seal tuvastatav HPV11 DNA. See on vastupidi 293FT rakkudes saadud tulemustele, kus oli kõige selgemalt tuvastatav pEGFPN3 DNA. Lisaks säilib HPV11 DNA uuritavates rakkudes suhteliselt stabiilselt läbi ajapunktide. See annab alust oletada, et HPV11 genoom replitseerub U2OS rakkudes. Selle kinnitamiseks tuleks teha täiendavaid uuringuid. Täiendavalt võiks uurida, kuidas tõhustada valmistatud viiruste replikatsiooni U2OS liini rakkudes ning miks see toimub nii madala tasemeliselt. Kõikide valmistatud viirus partiklite nakatamisvõimet võiks uurida ka teistes laborites kasutatavates rakuliinides, näiteks inimese keratinotsüütides, fibroblastides, HeLa (inimese emakakaelavähist alguse saanud rakuliin), või muudes sarnastes rakkudes.

2.3.3 HPV16-GFP virioni nakatamisvõime hindamine erinevates lahjendustes

293FT rakkude ja HPV16-GFP virionidega tehti ka katse, kus hinnati puhastamata GFP viiruste nakatamisvõimet kolmes erinevas lahjenduses. Selleks nakatati 293FT rakke järgmistes lahjendustes: 1:500, 1:5000 ja 1:50000 ning vaadeldi rakke fluorestsentsmikroskoobiga 48 tundi peale nakatamist. Tulemustest on näha, et GFP ekspressioon oli kõige suurem lahjenduses 1:500, aga see lahjenduse on ka rakkudele toksiline. Ka lahjenduses 1:5000 on GFP ekspressioon hästi näha ja elusrakkude arv Petri tassil üsna suur. Lahjenduses 1:50000 on GFP ekspressioon nõrgalt näha. Optimaalse lahjenduse leidmiseks arvestati ka southern blot analüüsi tulemusi ja järeldati, et viiruse lahjendus võiks olla vahemikus 1:1000 kuni 1:5000.



Joonis 8. Viiruse HPV16-GFP nakatamisvõime erinevates lahjendustes. Vasakul pool on pilt HPV16-GFP-ga nakatatud 293FT rakkudest läbivas valguses kasutades faaskontrasti 100x suurendusel ja paremal pool sama pilt fluorestsentsvalguse all. Rakke nakati kolmes lahjenduses: 1:500, 1:5000 ja 1:50000. Kõige suurem on GFP ekspressioon lahjenduses 1:500, väikseim lahjenduses 1:50000.

Kokkuvõttes täideti peamine eesmärk, milleks oli valmistada nakatamisvõimelisi viiruse partikleid. Kasutatud meetod sobib hästi GFP-d ekspresseeriva HPV pseudoviiruse valmistamiseks ja näidati, et vastav partikkel nakatab 293FT rakke ja on tuvastatav U2OS liini rakkudes. Kvaasivirion HPV16-18E genoom oli tuvastatav ainult 293FT liini rakkudes. HPV16-H11 virion nakatas U2OS liini rakke ja lahjenduses 1:1000 ka FT293 rakke, kuid DNA hulk nakatatud rakkudes oli väga väike. Selleks, et valmistatud kvaasivirione kasutada papilloomiviiruse elutsükli uurimiseks vajab meetod täiendamist või tuleks teha täiendavaid kaitseid, et leida optimaalsemad nakatamistingimused.

KOKKUVÕTE

Inimese papilloomiviirused on väikesed nahka-ja limaskesti nakatavad viirused, mille uurimiseks rakukultuuris kasutatakse tihti sünteetilisi viiruse partikleid. Nendeks võivad olla, kas viirus-laadsed partiklid, pseudovirionid või kvaasivirionid. Bakalaureusetöö annab ülevaate inimese papilloomiviiruste elutsüklist, nakatamisetappidest ja erinevate sünteetiliste viiruspartiklite valmistamisest ja kasutamisest. Eksperimentaalses osas valmistati HPV11 täisgenoomi ja HPV18 varajasi avatud lugemisraame sisaldavad kvaasivirionid ning GFP-d ekspresseerivad pseudovirionid. Vastavad plasmiidid pakiti kapsiidi HPV16 L1 ja L2 valkude abil. Valmis virionide nakamist hinnati 293FT ja U2OS rakuliinides ning jõuti järgmistele järeldustele:

- HPV16-GFP virionid nakatavad hästi 293FT rakuliini rakke ning GFP ekspressioon ilmneb 48 tundi peale nakatamist;
- Ka puhastamata HPV16-H11 ja HPV16-GFP viirused on nakatamisvõimelised;
- Valmistatud kvaasivirion HPV16-H18E nakatab 293FT liini rakke;
- HPV16-H18E virion ei nakata U2OS rakke;
- HPV16-H11 kvaasivirion nakatab 293FT rakke lahjenduses 1:1000;
- HPV16-H11 virion on võimeline nakatama U2OS liini rakke ja toimub viirugenoomi replikatsioon;
- Kasutatud metoodikat saab kasutada GFP-d ekspresseerivate HPV pseudovirionide valmistamiseks.
- HPV16-H11 ja HPV16-H18E kvaasivirionide kasutamiseks HPV replikatsiooni või muu viiruse nakatamietapi uurimiseks tuleks teha täiendavaid analüüse.

Construction and virulence analysis of human papillomavirus quasi-and pseudovirions in U2OS and 293FT cell lines

Annika Laanemets

Summary

Human papillomaviruses are small double-stranded DNA viruses that infect keratinocytes and their life cycle is tightly linked to epithelial differentiation. Papillomavirus infection is transmitted by direct contact with infected skin or mucosal epithelium. Some virus types called high-risk human papillomaviruses are associated with cervical, penile, vulvar, skin, anal, head-and neck cancers development. Low-risk papillomaviruses may cause common and genital warts. Even though papillomaviruses infections are quite common in population there is no specific treatment yet found because differentiation-dependent viral life cycle makes it difficult to study virus in laboratory. Usually organotypic raft culture or production of synthetic virus particles is used to get infectious viruses or virions similar to human papillomaviruses. There are three types of synthetic virus particles called virus-like particles, pseudovirions or quasivirions. Virus-like particles are empty papillomaviruses capsids, pseudovirions contain reporter plasmids and quasivirions contain papillomaviruses genomes.

This bachelor's thesis is focused on making HPV11 full genome and HPV18 early open reading frames containing quasivirions and construction of pseudovirions that express GFP using p16shell plasmid that contains HPV16 capsid proteins L1 and L2. p16shell plasmid was transfected to 293FT cells with HPV11 or HPV18 early construct containing minicircle genomes or with GFP expressing plasmid. Inside 293FT cells HPV capsid proteins pack transfected DNA and self-assemble into synthetic viruses. Virulence of prepared virions was analysed in U2OS and 293FT cells.

Our results show that HPV16-GFP pseudovirions infect both cell lines but efficiency of infection is better in 293FT cells. We could detect infection of HPV16-H18E virions infect only in 293FT cells. HPV11 genomes from HPV16-H11 quasivirions were detected in U2OS cells and in 293FT cells. Therefore used method is suitable for producing HPV16-GFP pseudovirions but needs improvements and additional analysis to make infectious quasivirions.

KASUTATUD KIRJANDUS

Kirjanduse loetelu

- Andrei, G., van den Oord, J., Fiten, P., Opdenakker, G., De Wolf-Peeters, C., De Clercq, E., & Snoeck, R. (2005). Organotypic Epithelial Raft Cultures as a Model for Evaluating Compounds against Alphaherpesviruses. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4671–4680.
- Arend, A., & Aunapuu, M. (2012). Histoloogia.
- Aydin, I., Weber, S., Snijder, B., Ventayol, P.S., Kühbacher, A., Becker, M., Day, P.M., Schiller, J.T., Kann, M., Pelkmans, L., Helenius, A., & Schelhaas, M. (2014). Large Scale RNAi Reveals the Requirement of Nuclear Envelope Breakdown for Nuclear Import of Human Papillomaviruses. *PLOS Pathogens* **10**, e1004162.
- Belnap, D.M., Olson, N.H., Cladel, N.M., Newcomb, W.W., Brown, J.C., Kreider, J.W., Christensen, N.D., & Baker, T.S. (1996). Conserved Features in Papillomavirus and Polyomavirus Capsids. *J Mol Biol* **259**, 249–263.
- Bergvall, M., Melendy, T., & Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology* **445**, 35–56.
- Bernard, H.-U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. zur, & de Villiers, E.-M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**, 70–79.
- Bienkowska-Haba, M., Luszczek, W., Myers, J.E., Keiffer, T.R., DiGiuseppe, S., Polk, P., Bodily, J.M., Scott, R.S., & Sapp, M. (2018). A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle. *PLOS Pathogens* **14**, e1006846.
- Bodily, J.M., Wrobel, G.A., Hennigan, C., & Rodriguez, C.M. (2013). Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by E7 and the cell cycle. *Virology* **443**, 11–19.
- Brown, D.R., Kitchin, D., Qadadri, B., Neptune, N., Batteiger, T., & Ermel, A. (2006). The human papillomavirus type 11 E1^{E4} protein is a transglutaminase 3 substrate and induces abnormalities of the cornified cell envelope. *Virology* **345**, 290–298.
- Bryan, J.T., & Brown, D.R. (2000). Association of the Human Papillomavirus Type 11 E1^{E4} Protein with Cornified Cell Envelopes Derived from Infected Genital Epithelium. *Virology* **277**, 262–269.
- Bryan, J.T., & Brown, D.R. (2001). Transmission of Human Papillomavirus Type 11 Infection by Desquamated Cornified Cells. *Virology* **281**, 35–42.
- Buck, C.B., Thompson, C.D., Pang, Y.-Y.S., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. (2005). Maturation of Papillomavirus Capsids. *J Virol* **79**, 2839–2846.
- Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Steven, A.C., Schiller, J.T., & Trus, B.L. (2008). Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. *J Virol* **82**, 5190–5197.
- Buck, C.B., Day, P.M., & Trus, B.L. (2013). The Papillomavirus Major Capsid Protein L1. *Virology* **445**, 169–174.

- Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G., & Harrison, S.C. (2000). Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. *Molecular Cell* **5**, 557–567.
- Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D.C., Murant, T., Broker, T.R., & Chow, L.T. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* **9**, 2335–2349.
- Chow, L.T., Reilly, S.S., Broker, T.R., & Taichman, L.B. (1987). Identification and mapping of human papillomavirus type 1 RNA transcripts recovered from plantar warts and infected epithelial cell cultures. *J Virol* **61**, 1913–1918.
- Conway, M.J., & Meyers, C. (2009). Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *J Dent Res* **88**, 307–317.
- Culp, T.D., & Christensen, N.D. (2004). Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* **319**, 152–161.
- Culp, T.D., Budgeon, L.R., Marinkovich, M.P., Meneguzzi, G., & Christensen, N.D. (2006a). Keratinocyte-Secreted Laminin 5 Can Function as a Transient Receptor for Human Papillomaviruses by Binding Virions and Transferring Them to Adjacent Cells. *J Virol* **80**, 8940–8950.
- Culp, T.D., Cladel, N.M., Balogh, K.K., Budgeon, L.R., Mejia, A.F., & Christensen, N.D. (2006b). Papillomavirus Particles Assembled in 293TT Cells Are Infectious In Vivo. *J Virol* **80**, 11381–11384.
- Day, P.M., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**, 1–11.
- DiGiuseppe, S., Luszczek, W., Keiffer, T.R., Bienkowska-Haba, M., Guion, L.G.M., & Sapp, M.J. (2016). Incoming human papillomavirus type 16 genome resides in a vesicular compartment throughout mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 6289–6294.
- DiMaio, D., & Petti, L. (2013). The E5 Proteins. *Virology* **445**, 99–114.
- Doorbar, J. (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* **445**, 80–98.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., & Stanley, M.A. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* **30**, F55–F70.
- Dziduszko, A., & Ozbun, M.A. (2013). Annexin A2 and S100A10 Regulate Human Papillomavirus Type 16 Entry and Intracellular Trafficking in Human Keratinocytes. *J Virol* **87**, 7502–7515.
- Embers, M.E., Budgeon, L.R., Culp, T.D., Reed, C.A., Pickel, M.D., & Christensen, N.D. (2004). Differential antibody responses to a distinct region of human papillomavirus minor capsid proteins. *Vaccine* **22**, 670–680.
- Evander, M., Frazer, I.H., Payne, E., Qi, Y.M., Hengst, K., & McMillan, N.A. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71**, 2449–2456.
- Everett, R.D. (2006). Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. *Cellular Microbiology* **8**, 365–374.

- Fareed, G.C. (1980). DNA tumor viruses. Molecular biology of tumor viruses, 2nd edition, Part 2: J. Tooze, ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. (1980). 958 pp. \$55.00. *Cell* **21**, 593.
- Finnen, R.L., Erickson, K.D., Chen, X.S., & Garcea, R.L. (2003). Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *J Virol* **77**, 4818–4826.
- Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R.E., & Sapp, M. (2002). Reorganization of Nuclear Domain 10 Induced by Papillomavirus Capsid Protein L2. *Virology* **295**, 97–107.
- Gambhira, R., Karanam, B., Jagu, S., Roberts, J.N., Buck, C.B., Bossis, I., Alphs, H., Culp, T., Christensen, N.D., & Roden, R.B.S. (2007). A Protective and Broadly Cross-Neutralizing Epitope of Human Papillomavirus L2. *J Virol* **81**, 13927–13931.
- Gillespie, K.A., Mehta, K.P., Laimins, L.A., & Moody, C.A. (2012). Human Papillomaviruses Recruit Cellular DNA Repair and Homologous Recombination Factors to Viral Replication Centers. *J Virol* **86**, 9520–9526.
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K.U., & Iftner, T. (1996). Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol* **70**, 2339–2349.
- Gu, W., Li, M., Zhao, W.M., Fang, N.X., Bu, S., Frazer, I.H., & Zhao, K.-N. (2004). tRNA^{Ser}(CGA) differentially regulates expression of wild-type and codon-modified papillomavirus L1 genes. *Nucleic Acids Res* **32**, 4448–4461.
- Hagensee, M.E., Yaegashi, N., & Galloway, D.A. (1993). Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **67**, 315–322.
- Hagensee, M.E., Olson, N.H., Baker, T.S., & Galloway, D.A. (1994). Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol* **68**, 4503–4505.
- Harper, D.M., Franco, E.L., Wheeler, C., et al. (2004). Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *The Lancet* **364**, 1757–1765.
- Helfer, C.M., Yan, J., & You, J. (2014). The Cellular Bromodomain Protein Brd4 has Multiple Functions in E2-Mediated Papillomavirus Transcription Activation. *Viruses* **6**, 3228–3249.
- Holmgren, S.C., Patterson, N.A., Ozbun, M.A., & Lambert, P.F. (2005). The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle. *J Virol* **79**, 3938–3948.
- Jang, M.K., Kwon, D., & McBride, A.A. (2009). Papillomavirus E2 Proteins and the Host Brd4 Protein Associate with Transcriptionally Active Cellular Chromatin. *J Virol* **83**, 2592–2600.
- Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E., & Ustav, M. (2009). Papillomavirus DNA replication — From initiation to genomic instability. *Virology* **384**, 360–368.

- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 12180–12184.
- Klumpp, D.J., & Laimins, L.A. (1999). Differentiation-Induced Changes in Promoter Usage for Transcripts Encoding the Human Papillomavirus Type 31 Replication Protein E1. *Virology* **257**, 239–246.
- López-Bueno, A., Mavian, C., Labella, A.M., Castro, D., Borrego, J.J., Alcami, A., & Alejo, A. (2016). Concurrence of Iridovirus, Polyomavirus, and a Unique Member of a New Group of Fish Papillomaviruses in Lymphocystis Disease-Affected Gilthead Sea Bream. *J Virol* **90**, 8768–8779.
- Lowy, D.R. (2016). HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. *J Clin Invest* **126**, 5–11.
- Lowy, D.R., & Schiller, J.T. (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* **116**, 1167–1173.
- Ma, B., Roden, R.B., Hung, C.-F., & Wu, T.-C. (2011). HPV pseudovirions as DNA delivery vehicles. *Ther Deliv* **2**, 427–430.
- Mao, C., Koutsky, L.A., Ault, K.A., Wheeler, C.M., Brown, D.R., Wiley, D.J., Alvarez, F.B., Bautista, O.M., Jansen, K.U., & Barr, E. (2006). Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* **107**, 18–27.
- McBride, A.A. (2008). Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. *Adv Virus Res* **72**, 155–205.
- McBride, A.A. (2013). The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* **445**, 57–79.
- McBride, A.A. (2017a). Oncogenic human papillomaviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **372**.
- McBride, A.A. (2017b). Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biological Chemistry* **398**, 919–927.
- McIntosh, P.B., Martin, S.R., Jackson, D.J., Khan, J., Isaacson, E.R., Calder, L., Raj, K., Griffin, H.M., Wang, Q., Laskey, P., Eccleston, J.F., & Doorbar, J. (2008). Structural Analysis Reveals an Amyloid Form of the Human Papillomavirus Type 16 E1/E4 Protein and Provides a Molecular Basis for Its Accumulation. *J Virol* **82**, 8196–8203.
- McLaughlin-Drubin, M.E., & Meyers, C. (2005a). Propagation of infectious, high-risk HPV in organotypic “raft” culture. *Methods Mol. Med.* **119**, 171–186.
- McLaughlin-Drubin, M.E., & Meyers, C. (2005b). Propagation of Infectious, High-Risk HPV in Organotypic “Raft” Culture. In *Human Papillomaviruses*, (Humana Press), pp. 171–186.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Wilson, S., Mullikin, B., Suzich, J., & Meyers, C. (2003). Human papillomavirus type 45 propagation, infection, and neutralization. *Virology* **312**, 1–7.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Crum, C.P., & Münger, K. (2011). Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2130–2135.

- Meyers, C., Frattini, M.G., Hudson, J.B., & Laimins, L.A. (1992). Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* **257**, 971–973.
- Miller, A.D. (2012). Chapter 6 - Neoplasia and Proliferative Disorders of Nonhuman Primates. In *Nonhuman Primates in Biomedical Research (Second Edition)*, C.R. Abee, K. Mansfield, S. Tardif, & T. Morris, eds. (Boston: Academic Press), pp. 325–356.
- Milligan, S.G., Veerapraditsin, T., Ahamet, B., Mole, S., & Graham, S.V. (2007). Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells. *Virology* **360**, 172–181.
- Moody, C.A., & Laimins, L.A. (2009). Human Papillomaviruses Activate the ATM DNA Damage Pathway for Viral Genome Amplification upon Differentiation. *PLOS Pathogens* **5**, e1000605.
- Ozbun, M.A. (2002). Human Papillomavirus Type 31b Infection of Human Keratinocytes and the Onset of Early Transcription. *J Virol* **76**, 11291–11300.
- Ozbun, M.A., & Meyers, C. (1997). Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol* **71**, 5161–5172.
- Porter, S., Stepp, W.H., Stamos, J., & McBride, A.A. (2017). HOST CELL RESTRICTION FACTORS THAT LIMIT TRANSCRIPTION AND REPLICATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS. *Virus Res* **231**, 10–20.
- Pyeon, D., Lambert, P.F., & Ahlquist, P. (2005). Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9311–9316.
- Querbes, W., O'Hara, B.A., Williams, G., & Atwood, W.J. (2006). Invasion of Host Cells by JC Virus Identifies a Novel Role for Caveolae in Endosomal Sorting of Noncaveolar Ligands. *J Virol* **80**, 9402–9413.
- Reinson, T., Toots, M., Kadaja, M., Pipitch, R., Allik, M., Ustav, E., & Ustav, M. (2013). Engagement of the ATR-Dependent DNA Damage Response at the Human Papillomavirus 18 Replication Centers during the Initial Amplification. *J Virol* **87**, 951–964.
- Rivera-Molina, Y.A., Martínez, F.P., & Tang, Q. (2013). Nuclear domain 10 of the viral aspect. *World J Virol* **2**, 110–122.
- Roberts, J.N., Buck, C.B., Thompson, C.D., Kines, R., Bernardo, M., Choyke, P.L., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. (2007). Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nature Medicine* **13**, 857–861.
- Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology* **445**, 138–168.
- Rose, R.C., Bonnez, W., Reichman, R.C., & Garcea, R.L. (1993). Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles. *J Virol* **67**, 1936–1944.
- Sakakibara, N., Chen, D., & McBride, A.A. (2013). Papillomaviruses Use Recombination-Dependent Replication to Vegetatively Amplify Their Genomes in Differentiated Cells. *PLOS Pathogens* **9**, e1003321.

- Scheffer, K.D., Gawlitza, A., Spoden, G.A., Zhang, X.A., Lambert, C., Berditchevski, F., & Florin, L. (2013). Tetraspanin CD151 Mediates Papillomavirus Type 16 Endocytosis. *J Virol* **87**, 3435–3446.
- Selinka, H.-C., Giroglou, T., Nowak, T., Christensen, N.D., & Sapp, M. (2003). Further Evidence that Papillomavirus Capsids Exist in Two Distinct Conformations. *J Virol* **77**, 12961–12967.
- Shah, S.D., Doorbar, J., & Goldstein, R.A. (2010). Analysis of Host–Parasite Incongruence in Papillomavirus Evolution Using Importance Sampling. *Mol Biol Evol* **27**, 1301–1314.
- Stubenrauch, F., & Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars in Cancer Biology* **9**, 379–386.
- Vande Pol, S.B., & Klingelutz, A.J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* **445**, 115–137.
- de Villiers, E.-M. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* **445**, 2–10.
- Wang, J.W., & Roden, R.B.S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* **445**, 175–186.
- Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P., Davy, C., Masterson, P.J., Walker, P.A., Laskey, P., Omary, M.B., & Doorbar, J. (2004). Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1/E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo and In Vitro Keratin Filament Reorganization. *J Virol* **78**, 821–833.
- Wang, X., Meyers, C., Wang, H.-K., Chow, L.T., & Zheng, Z.-M. (2011). Construction of a Full Transcription Map of Human Papillomavirus Type 18 during Productive Viral Infection ▽. *J Virol* **85**, 8080–8092.
- Yang, R., Wheeler, C.M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D.V., Viscidi, R.P., & Roden, R.B.S. (2005). Papillomavirus Capsid Mutation To Escape Dendritic Cell-Dependent Innate Immunity in Cervical Cancer. *J Virol* **79**, 6741–6750.
- Zhang, W., Carmichael, J., Ferguson, J., Inglis, S., Ashrafian, H., & Stanley, M. (1998). Expression of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein in *Escherichia coli*: Denaturation, Renaturation, and Self-Assembly of Virus-like Particles in Vitro. *Virology* **243**, 423–431.
- Zheng, Z.-M., & Baker, C.C. (2006). PAPILLOMAVIRUS GENOME STRUCTURE, EXPRESSION, AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION. *Front Biosci* **11**, 2286–2302.

Kasutatud veebiaadressid

„293T cells“. GenHunter Corporation. Kasutatud 07. 05.2018.

<http://www.genhunter.com/products/293t-cells.html>

Addgene. Kasutatud 20.03.2018. <https://www.addgene.org/37320/>

„FDA Licensure of Bivalent Human Papillomavirus Vaccine (HPV2, Cervarix) for Use in Females and Updated HPV Vaccination Recommendations from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)“. Centers for Disease Control and Prevention. Kasutatud 7. 03.2018. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5920a4.htm>

„HPV and Cancer“. CgvFactSheet. National Cancer Institute. Kasutatud 28. 04.2018.

<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-fact-sheet>

Novopro. Kasutatud 20.03.2018.

<http://www.novopro.cn/resource/unzip/Fluorescent%20Protein%20Genes%20&%20Plasmids/pEGFP-N3%20Map.png>

Production of Papillomaviral Vectors (Pseudoviruses). National Cancer Institute. Kasutatud 12.12.2017. <https://home.ccr.cancer.gov/Lco/pseudovirusproduction.htm>

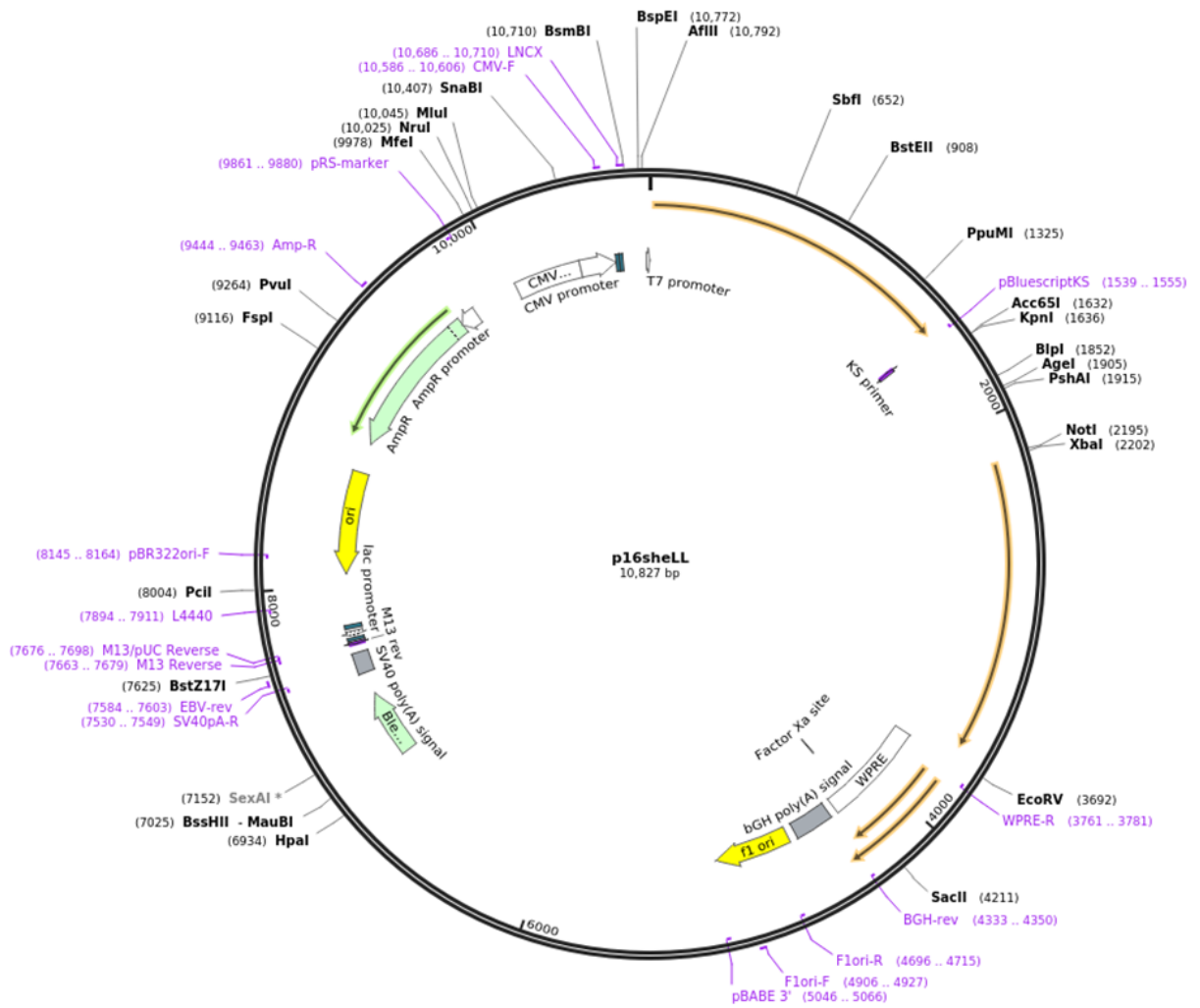
The PapillomaVirus Episteme (PaVE). Kasutatud 03.05.2018. <https://pave.niaid.nih.gov/>

„What is GARDASIL®9 (Human Papillomavirus 9-valent Vaccine, Recombinant) ?“

Official site of gardasil 9 (human papillomavirus 9-valent vaccine, recombinant). Kasutatud 07.05.2018. <https://www.gardasil9.com/about-gardasil9/what-is-gardasil9/>

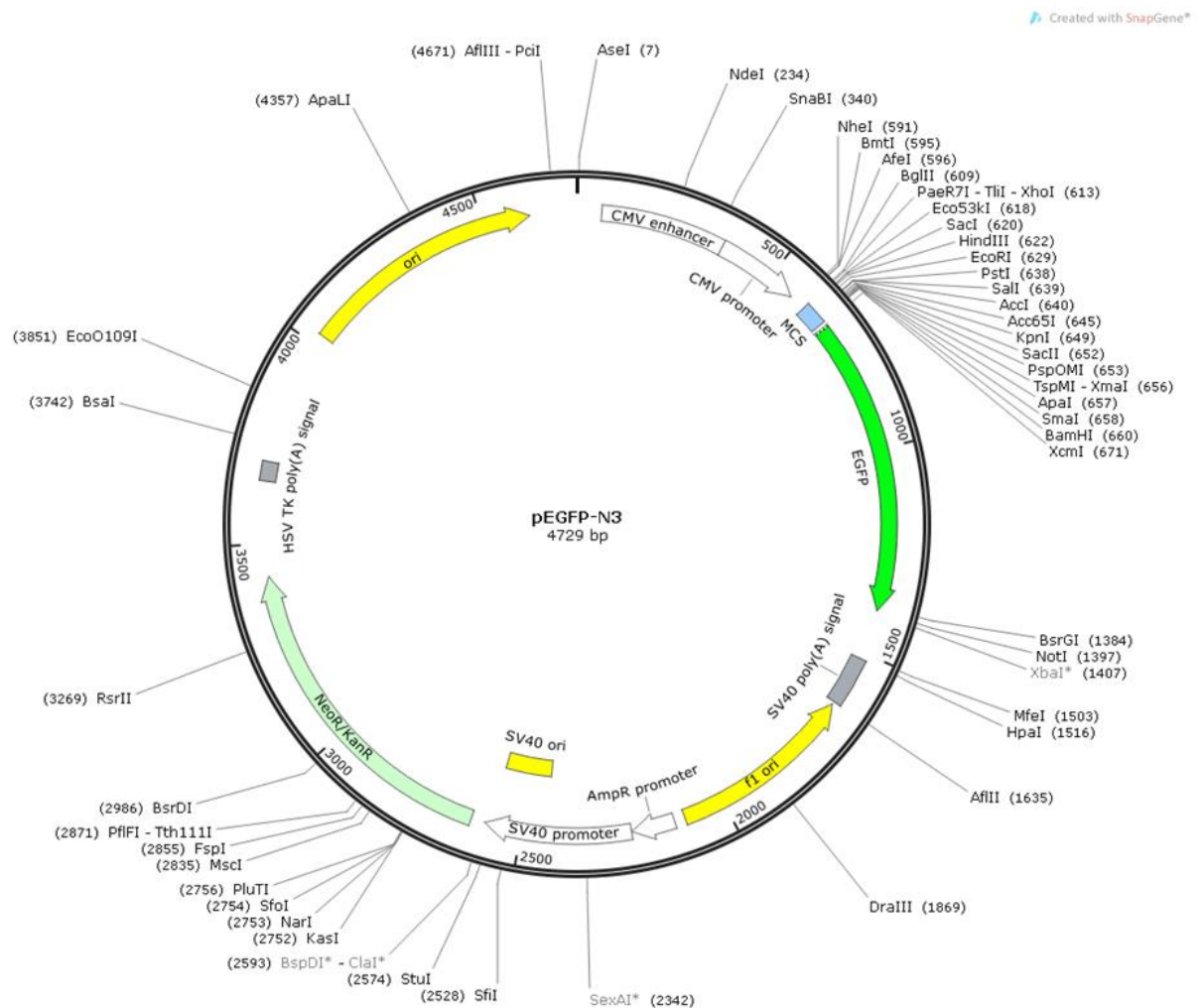
LISA 1

Created with SnapGene®



Joonis 9. Plasmidi p16SheLL kaart (<https://www.addgene.org/37320/>).

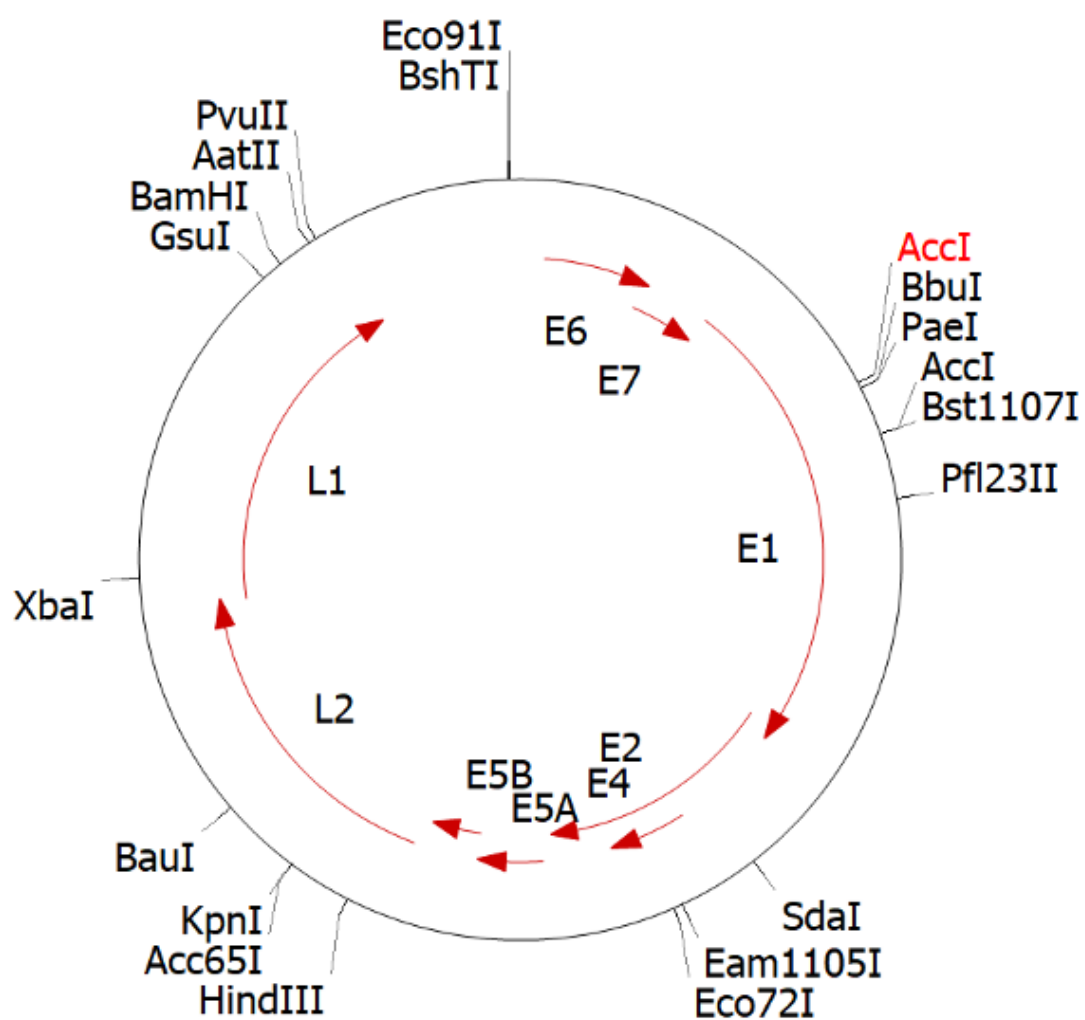
LISA 2



Joonis 10. Plasmidi pEGFPN3 kaart

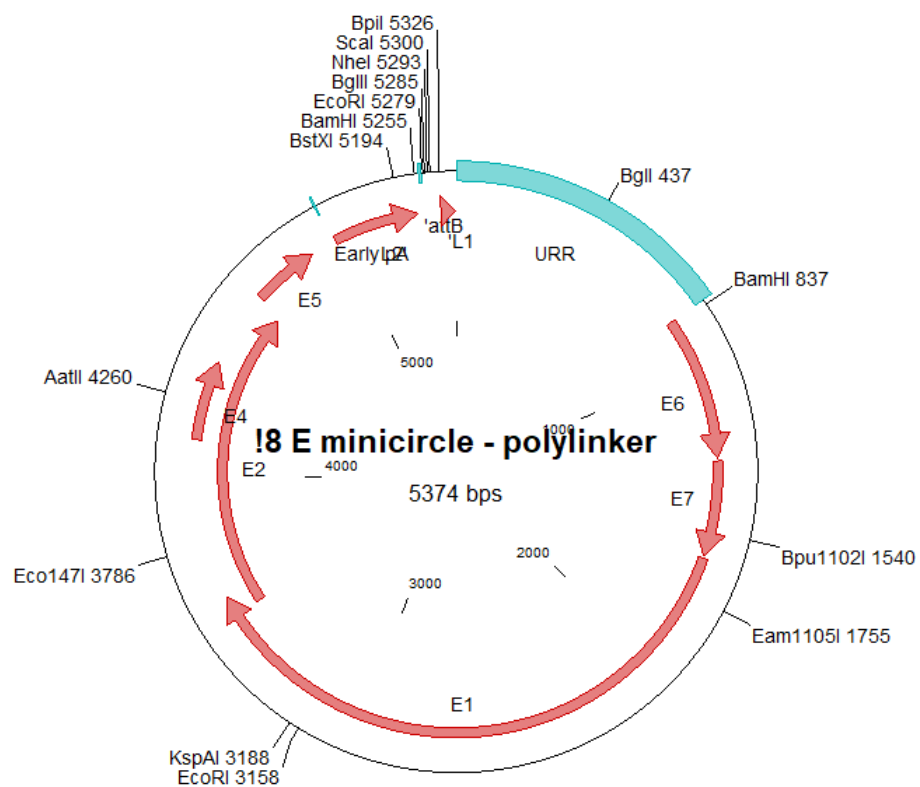
(<http://www.novopro.cn/resource/unzip/Fluorescent%20Protein%20Genes%20&%20Plasmids/pEGFP-N3%20Map.png>).

LISA 3



Joonis 11. HPV11 *minicircle* genoomi kaart.

LISA 4



Joonis 12. HPV18 varajasi avatud lugemisraame sisaldav *minicircle* genoom.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Annika Laanemets (sünnikuupäev: 11.06.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Inimese papilloomiviiruste kvaasi-ja pseudovirionide konstrueerimine ning nakatamisvõime analüüsimine U2OS ja 293FT rakuliinides, mille juhendaja on Marko Piirsoo,

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2018